

# Phytochemische und pharmakologische *in vitro*

## Untersuchungen zu *Hypericum hirsutum* L.



### Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Julianna Max geb. Ziegler**

aus Makinsk (Kasachstan)

2019

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2015 bis Dezember 2018 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 21.06.2019

Datum der mündlichen Prüfung: 23.07.2019

|                    |                           |                  |
|--------------------|---------------------------|------------------|
| Prüfungsausschuss: | Prof. Dr. Sigurd Elz      | (Vorsitzender)   |
|                    | Prof. Dr. Jörg Heilmann   | (Erstgutachter)  |
|                    | Prof. Dr. Thomas Schmidt  | (Zweitgutachter) |
|                    | Prof. Dr. Joachim Wegener | (Dritter Prüfer) |







## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die auf fachliche oder persönliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich während meiner Promotionszeit begleitet haben.

Zu allererst richtet sich mein Dank an Prof. Dr. Jörg Heilmann. Lieber Jörg, vielen Dank für die Möglichkeit die Herausforderung „Dissertation“ an Deinem Lehrstuhl bestreiten zu dürfen. Danke für das mir entgegengebrachte Vertrauen, deine große Unterstützung bei der Bearbeitung des spannenden und herausfordernden Promotionsthemas, die wertvollen Fachgespräche, Diskussionen und konstruktive Kritik sowie dein offenes Ohr auch bei privaten Themen. Alles in allem ein herzliches Dankeschön für vier wundervolle Jahre, die mir immer in Erinnerung bleiben werden.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Sigurd Elz für die großzügige finanzielle Förderung während der Promotionszeit und die Möglichkeit mich in seinen Praktika einzubringen.

Darüber hinaus geht mein Dank an PD Dr. Guido Jürgenliemk. Lieber Guido, danke, dass du in mir den Wunsch zu promovieren geweckt und damit den Grundstein dieser Promotion gelegt hast. Ich bedanke mich außerdem für viele fachliche, aber auch persönliche Ratschläge, für tolle und interessante Tage in Novi Sad und auch die schönen botanischen Exkursionen in Südtirol. Danke für die vielen gemeinsamen lustigen Momente und die ein oder andere Weinempfehlung.

Zudem bin ich der guten Seele des Lehrstuhls, Gabriele Brunner, zu Dank verpflichtet. Liebe Gabi, vielen Dank für das Beantworten zigtausender Fragen in den letzten vier Jahren, für Tipps und Tricks im Umgang mit so mancher Zelllinie und für die Unterstützung bei allen großen und kleinen Hürden des Laboralltags.

Ein herzliches Dankeschön auch an die NMR-Abteilung der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, insbesondere Fritz Kastner, für die stets schnellstmöglich durchgeführten NMR-Experimente, die für die Strukturaufklärung unerlässlich waren.

Auch der massenspektroskopischen Abteilung der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität, allen voran Josef Kiermaier, soll für die Aufnahme der MS-Daten und die Beantwortung unzähliger Fragen recht herzlich gedankt werden.

PD Dr. Axel Dürkop möchte ich für die Hilfestellung bei der Aufnahme der CD-Spektren meinen Dank aussprechen.

Meinen Dank ausdrücken möchte ich auch Prof. Dr. Stefan Zahler für die wertvollen Gespräche und die Bereitstellung der HMEC-1-Zellen.

Auch PD Dr. Birgit Kraus sei an dieser Stelle für zahlreiche Anregungen bei den zellbiologischen Arbeiten und hilfreichen Diskussionen gedankt. Liebe Birgit, vielen Dank für eine schöne gemeinsame Zeit und das Überlassen der Karten für das Harry Potter Theaterstück in London.

Uta Hasselmann und Frau Ohli gilt für die stetige Hilfe bei der Bewältigung jeglicher Aufgabe im Bürokratie- und Verwaltungsdschungel ebenfalls mein herzlicher Dank. Zudem danke ich Anne Grashuber für das Beantworten zahlreicher Fragen und die Bereitstellung diverser Reagenzien.

Vielen Dank an Dr. Steffen Pockes und das ganze Team für eine stets angenehme Zusammenarbeit in der Praktikumsbetreuung, eine phantastische gemeinsame Zeit und unvergessliche Abende bei abschließenden Assistententreffen.

Dr. Sebastian Schmidt, Dr. Stefan Wiesneth und Markus Löhr möchte ich für das Sammeln und Trocknen des in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials danken. Stefan, ich weiß deinen todesmutigen Einsatz trotz Zeckenplage zu schätzen. Ein Dankeschön richtet sich auch an Katharina Krautbauer, die als Wahlpflichtpraktikantin am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, die Zerkleinerung und die fraktionierte Extraktion des Pflanzenmaterials übernommen hat.

Vielen Dank an meine Wahlpflichtpraktikanten, Sebastian Fischer, Vanessa Wimmer, Theresa Lohr und Julia Kralik sowie den beiden Forschungspraktikanten Kevin Heizler und Benedikt Moissl für die engagierte und hilfreiche Mitarbeit sowohl bei der Isolierung als auch der Testung meiner Substanzen.

Bei allen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie möchte ich mich für eine intensive, lustige gemeinsame Zeit bedanken.

Dr. Daniel Bücherl, Dr. Marcel Flemming und Dr. Petr Jirasek danke, dass ihr mir tolle Momente am Lehrstuhl während meinem PJ beschert habt.

Ich danke außerdem Dr. Beata Hobelsberger, Dr. Rosmarie Scherübl und Dr. Monika Schwindl für die schnelle und unkomplizierte Eingliederung in den Kreis der Hühner. Vielen Dank für so viele unvergessliche Momente und TV-Abende bei denen es um so viel mehr als nur um Heidis Meeedchen ging. Liebe Moni, dir ein ganz besonderer Dank für deine tolle Betreuung während meinem PJ und deine motivierenden Worte.

Dr. Sebastian Schmidt danke ich für die Bemühungen mich in die hohe Kunst der NMR-Strukturaufklärung einzuführen und das Korrekturlesen dieser Arbeit mit stets konstruktiver Kritik.

Ein herzliches Dankeschön auch an die „jetzigen“ Kolleginnen und Kollegen:

Dr. Katharina Schiller, Mutti, lass dir danken für eine wundervolle gemeinsame Promotionszeit. Ich erinnere mich nur allzu gerne an die vielen humorvollen Momente, die phantastischen Events und die unzähligen Gespräche, bei denen es um Gott und die Welt ging. Vielen Dank, dass du so schnell von einer Arbeitskollegin zu einer Freundin geworden bist und das hoffentlich auch noch lange bleiben wirst.

Mirjam Abu Salah, vielen Dank für die relativ kurze, aber dafür umso intensivere gemeinsame Zeit. Danke für das gemütliche Couch-Lümmeln, die mehr oder weniger erfolgreiche Motivation zum Sport und deine unbändige Energie mit der du jeden ansteckst.

Dr. Christian Zeh, danke ich für seine Unterstützung vor allem in der Anfangsphase meiner Promotion. Lieber Christian, ohne deinen Rat wäre ich mit Sicherheit das ein oder andere Mal verzweifelt. Danke, für das schöne Miteinander im Labor und für die viele humorvollen, albern, aber auch tiefgründigen Gespräche auf Heimwegen bei Tag und auch bei Nacht.

Ein großer Dank geht auch an Eva Lotter und Elisabeth Grünstein für so manche lustige Abendgestaltung und die vielen außerlaborlichen Events.

Martina Tremmel, ohne dich wäre das Arbeiten in der Zellkultur nur halb so schön gewesen. Merci dir für die ein oder andere frühmorgendliche Gesangseinlage, für den neusten Klatsch und Tratsch und natürlich für die Durchführung des Griess-Assays.

Des Weiteren gilt mein Dank Sebastian Schwindl für seine Hilfestellung bei so manchem technischen Problem. Lieber Sebi, vielen Dank für die schöne gemeinsame Zeit und für die erheiternden Einblicke in deine Kindheit.

Dr. Stefan Wiesneth danke ich für sein ruhiges Gemüt und seine hilfsbereite Art. Lieber Stefan, ein herzliches Dankeschön für deine Hilfestellung bei so vielen PC-Problemen, für deine Ratschläge in allen Belangen und für zahlreiche Diskussionen und Missverständnisse, die den Arbeitsalltag erheiterten. Am Ende des Tages bleibt es auch egal ob der Pullover weinrot, aubergine- oder pflaum-farben ist.

Dr. Steffen Pockes, danke ich für sein offenes Ohr und seinen Rat bei dem ein oder anderen chemischen Problem. Lieber Steffen, vielen Dank für die vielen lustigen gemeinsamen Abende im Hause Pockes, die immer wieder ein Highlight zur Wochenmitte darstellten.

Dr. Ilya Volkov, danke dir, dass du deine Erfahrungen bei der Isolierung von Acylphloroglucinolen und die Geheimnisse der Strukturaufklärung immer hilfsbereit mit mir geteilt hast. Außerdem vielen Dank für deine Begleitung auf so vielen Busfahrten nach München und die damit verbundenen Gespräche.

Ein herzliches Dankeschön meinerseits geht außerdem an Dr. Edna Makule, Sina Malenke, Kathrin Kuck, Dr. Christoph Dorn, Dr. Filip Šibul, Bernhard Kram und Thomas Gruber für die schöne und tolle Zeit sowie das kollegiale und hilfsbereite Miteinander.

Meinen lieben Freunden aus dem schönen Allgäu und meinen Regensburger-Girls danke ich für ihre langjährige Freundschaft. Treffen und Gespräche mit euch waren so oft „Seelenstreichler“ und haben meinen Blick wieder auf das Wesentliche gerichtet. Hervorheben möchte ich Juliane Brandl, mit der ich mich Seite an Seite durch das Studium geschlagen habe und die so viel mehr darstellt als eine lose Studienbekanntschaft.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Familie, insbesondere meine Eltern und meinen Bruder. Danke für euren unerschütterlichen Glauben an mich und meine Arbeit, für eure bedingungslose Liebe und eure unermüdliche Unterstützung in all den Jahren. Ohne euch an meiner Seite wäre ich sicherlich nicht so weit gekommen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Herzbuben Flo bedanken, der mich mit seiner herrlich unkomplizierten Art erdet und mir immer wieder ein Lächeln ins Gesicht zaubert. Vielen Dank für deine unermessliche Liebe, deine Geduld und Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit.

*Meinen geliebten Eltern*

Mit all meiner Liebe und Dankbarkeit für alles,  
was sie für mich getan und mir ermöglicht haben.

## Publikationsliste

### Posterbeiträge:

**65<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA)**

**Basel, Switzerland, 3<sup>rd</sup> – 7<sup>th</sup> September 2017**

Julianna Ziegler, Jörg Heilmann (2017): Isolation and Structure Elucidation of four new polycyclic acylphloroglucinols from *Hypericum hirsutum* L.



# Inhaltsverzeichnis

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Johanniskraut in der Geschichte .....</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Die Gattung <i>Hypericum</i> L.....</b>                                 | <b>3</b>  |
| 1.2.1      | Sektion 18 <i>Taeniocarpium</i> JAUB. & SPACH.....                         | 7         |
| 1.2.2      | <i>Hypericum hirsutum</i> L.....   | 9         |
| <b>1.3</b> | <b>Acylphloroglucinole .....</b>   | <b>14</b> |
| 1.3.1      | Biosynthese der Acylphloroglucinole .....                                  | 14        |
| 1.3.2      | Strukturelle Vielfalt und Klassifizierung der Acylphloroglucinole .....    | 15        |
| <b>1.4</b> | <b>Zielsetzung .....</b>   | <b>21</b> |
| 1.4.1      | Isolierung von Acylphloroglucinolinen aus <i>Hypericum hirsutum</i> L..... | 21        |
| 1.4.2      | Zellbiologische Testung ausgewählter Substanzen .....                      | 21        |
| <b>2</b>   | <b>ISOLIERUNG .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1      | Allgemeine Geräte, Gefäße und Software .....                               | 22        |
| 2.1.2      | Pflanzenmaterial und Extraktion .....                                      | 23        |
| 2.1.3      | Fraktionierung und Isolierung .....  | 23        |
| 2.1.3.1    | Fraktionskontrolle.....  | 23        |
| 2.1.3.1.1  | Dünnschichtchromatographie .....   | 24        |
| 2.1.3.1.2  | <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....                                      | 26        |
| 2.1.3.2    | Säulenchromatographie an Diaion® HP-20.....                                | 26        |
| 2.1.3.3    | Flash-Chromatographie.....   | 28        |
| 2.1.3.4    | Zentrifugal-Verteilungschromatographie (CPC).....                          | 30        |
| 2.1.3.5    | Analytische HPLC .....   | 32        |
| 2.1.3.6    | Semi-präparative HPLC.....   | 34        |
| 2.1.4      | Strukturaufklärung und Charakterisierung .....                             | 38        |
| 2.1.4.1    | NMR-Spektroskopie .....  | 38        |
| 2.1.4.2    | Massenspektrometrie .....  | 39        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.1.4.3    | UV-Vis-Spektroskopie .....   | 40        |
| 2.1.4.4    | Polarimetrie .....   | 41        |
| 2.1.4.5    | Circulardichroismus .....  | 42        |
| <b>2.2</b> | <b>Isolierungsschema .....</b>   | <b>44</b> |
| 2.2.1      | Isolierungsstrategie .....   | 44        |
| 2.2.2      | Entfettung des <b>PE-Extraktes</b> mittels Säulenchromatographie an Diaion® HP-20 .... | 46        |
| 2.2.3      | Fraktionierung von <b>PE.1</b> mittels Flash-Chromatographie .....                     | 47        |
| 2.2.4      | Fraktionierung von <b>PE.1.3</b> mittels CPC .....                                     | 49        |
| 2.2.4.1    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.1.3.2</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 52        |
| 2.2.4.2    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.1.3.3</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 55        |
| 2.2.4.3    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.1.3.4</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 58        |
| 2.2.4.4    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.1.3.6</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 60        |
| 2.2.5      | Fraktionierung von <b>PE.1.4</b> per CPC .....   | 63        |
| 2.2.5.1    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.1.4.3</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 65        |
| 2.2.6      | Fraktionierung von <b>PE.2</b> mittels Flash-Chromatographie .....                     | 68        |
| 2.2.7      | Fraktionierung von <b>PE.2.2</b> mittels CPC .....                                     | 70        |
| 2.2.7.1    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.2.2.2</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 72        |
| 2.2.7.2    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.2.2.4</b> per semi-präparativer HPLC .....     | 74        |
| 2.2.8      | Fraktionierung von <b>PE.2.3</b> mittels CPC .....                                     | 76        |
| 2.2.9      | Fraktionierung von <b>PE.2.3.2</b> mittels Flash-Chromatographie .....                 | 79        |
| 2.2.9.1    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.2.3.2.2</b> per semi-präparativer HPLC ....    | 81        |
| 2.2.9.2    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.2.3.2.5</b> per semi-präparativer HPLC ....    | 83        |
| 2.2.9.3    | Isolierung von Reinsubstanzen aus <b>PE.2.3.2.6</b> per semi-präparativer HPLC ....    | 85        |
| 2.2.9.3.1  | Untersuchung der Doppelbande für <b>PE.2.3.2.6-2</b> und <b>-6</b> .....               | 88        |
| <b>2.3</b> | <b>Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen .....</b>      | <b>91</b> |
| 2.3.1      | Allgemeine Strukturelemente .....  | 91        |
| 2.3.1.1    | Die Acylseitenkette .....  | 91        |
| 2.3.1.2    | Die Prenylsubstituenten .....  | 96        |
| 2.3.2      | Acylphloroglucinole vom Typ-A (Hyperforin-Typ) .....                                   | 100       |
| 2.3.2.1    | Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts .....                                     | 100       |
| 2.3.2.2    | Substanzen <b>1</b> , <b>2</b> und <b>3</b> .....                                      | 102       |
| 2.3.2.3    | Substanz <b>4</b> .....  | 112       |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 2.3.3      | Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ.....                    | 117        |
| 2.3.3.1    | Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts.....             | 117        |
| 2.3.3.2    | Substanzen <b>5, 6</b> und <b>7</b> .....                     | 121        |
| 2.3.3.3    | Substanzen <b>8</b> und <b>9</b> .....                        | 126        |
| 2.3.4      | Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ.....                | 132        |
| 2.3.4.1    | Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts.....             | 132        |
| 2.3.4.2    | Substanzen <b>10, 11, 12</b> und <b>13</b> .....              | 135        |
| 2.3.4.3    | Substanzen <b>14, 15</b> und <b>16</b> .....                  | 142        |
| 2.3.4.4    | Substanzen <b>17</b> und <b>18</b> .....                      | 148        |
| 2.3.4.5    | Substanzen <b>19, 20</b> und <b>21</b> .....                  | 153        |
| 2.3.4.6    | Substanzen <b>22, 23, 24</b> und <b>25</b> .....              | 158        |
| 2.3.5      | Acylphloroglucinole vom Typ-B I (Clusianon-Typ) .....         | 166        |
| 2.3.5.1    | Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts.....             | 166        |
| 2.3.5.2    | Substanzen <b>26</b> und <b>27</b> .....                      | 168        |
| 2.3.6      | Weitere Substanzen .....                                      | 175        |
| 2.3.6.1    | Substanzen <b>28</b> und <b>29</b> .....                      | 175        |
| 2.3.6.2    | Substanz <b>30</b> .....                                      | 179        |
| <b>2.4</b> | <b>Zusammenfassung und Diskussion .....</b>                   | <b>183</b> |
| 2.4.1      | Überblick über die isolierten Verbindungen .....              | 183        |
| 2.4.2      | Chemotaxonomische Einordnung der isolierten Verbindungen..... | 192        |
| 2.4.2.1    | Acylphloroglucinole vom A-Typ .....                           | 192        |
| 2.4.2.2    | Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ.....                    | 195        |
| 2.4.2.3    | Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ.....                | 196        |
| 2.4.2.4    | Acylphloroglucinole vom B I-Typ .....                         | 196        |
| 2.4.2.5    | Weitere Substanzen .....                                      | 198        |
| 2.4.2.6    | Einordnung in das bestehende System .....                     | 201        |
| <b>3</b>   | <b>ZELLBIOLOGISCHE TESTUNG.....</b>                           | <b>203</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                            | <b>203</b> |
| 3.1.1      | Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien .....          | 203        |
| 3.1.1.1    | Geräte und Software .....                                     | 203        |
| 3.1.1.2    | Verbrauchsmaterialien .....                                   | 205        |
| 3.1.1.3    | Kulturmedien und sonstige Lösungen.....                       | 206        |
| 3.1.2      | Verwendete Zelllinien .....                                   | 208        |



|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 3.1.3       | Allgemeine Verfahren .....  | 209        |
| 3.1.3.1     | In-Kulturnahme der Zellen .....   | 209        |
| 3.1.3.2     | Kultivierung der Zellen.....  | 210        |
| 3.1.3.3     | Subkultivierung der Zellen (Passagieren) .....  | 210        |
| 3.1.3.4     | Bestimmung der Zellzahl .....   | 211        |
| 3.1.3.5     | Kryokonservierung der Zellen.....   | 212        |
| 3.1.3.6     | Herstellen der Untersuchungslösungen.....   | 213        |
| 3.1.4       | Durchgeführte Assays .....  | 213        |
| 3.1.4.1     | MTT-Assay.....  | 213        |
| 3.1.4.2     | Proliferations-Assay .....  | 216        |
| 3.1.4.2.1   | Bildung neuer Blutgefäße .....  | 216        |
| 3.1.4.2.2   | Versuchsdurchführung.....   | 217        |
| 3.1.4.3     | Migrations-Assay.....   | 220        |
| 3.1.4.3.1   | Angiogenetische Kaskade .....   | 220        |
| 3.1.4.3.2   | Versuchsdurchführung.....   | 220        |
| 3.1.4.4     | ICAM-1-Assay .....  | 222        |
| 3.1.4.4.1   | Die Rolle des Oberflächenmoleküls ICAM-1 in Entzündungsprozessen.....                             | 222        |
| 3.1.4.4.2   | Versuchsdurchführung.....   | 225        |
| 3.1.4.5     | Griess-Assay.....   | 229        |
| 3.1.4.5.1   | Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) .....  | 229        |
| 3.1.4.5.2   | Versuchsdurchführung.....   | 230        |
| 3.1.4.6     | Neurotoxizitäts- und Neuroprotektivitäts-Assay .....  | 233        |
| 3.1.4.6.1   | Hintergrund.....  | 233        |
| 3.1.4.6.1.1 | Freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress .....                            | 233        |
| 3.1.4.6.1.2 | Glutamat-induzierte Neurotoxizität.....   | 233        |
| 3.1.4.6.2   | Versuchsdurchführung.....   | 235        |
| 3.1.4.7     | Statistische Auswertung der Ergebnisse .....  | 237        |
| <b>3.2</b>  | <b>Auswertung und Diskussion der zellbiologischen Ergebnisse .....</b>                            | <b>238</b> |
| 3.2.1       | Ermittlung der Zellviabilitäten von HMEC-1-Zellen.....  | 238        |
| 3.2.2       | Einfluss ausgewählter Substanzen auf unterschiedliche Punkte in der Kaskade der Angiogenese ..... | 242        |
| 3.2.2.1     | Proliferationshemmung .....   | 242        |
| 3.2.2.2     | Migrationshemmung.....  | 245        |
| 3.2.2.3     | Zusammenfassung und Literaturdaten .....  | 246        |
| 3.2.3       | Effekte auf unterschiedliche Angriffspunkte im komplexen Entzündungsprozess ..                    | 247        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.2.3.1  | Hemmung der ICAM-1 Expression bei HMEC-1-Zellen .....                    | 247        |
| 3.2.3.2  | Hemmung der NO-Produktion bei RAW 264.7-Zellen.....                      | 251        |
| 3.2.3.3  | Zusammenfassung und Literaturdaten .....                                 | 255        |
| 3.2.4    | Untersuchung der neurotoxischen und der neuroprotektiven Aktivität ..... | 257        |
| 3.2.4.1  | Hemmung der Glutamat-induzierten Toxizität bei HT-22-Zellen .....        | 257        |
| 3.2.4.2  | Zusammenfassung und Literaturdaten .....                                 | 260        |
| <b>4</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>262</b> |
| <b>5</b> | <b>SUMMARY .....</b>   | <b>265</b> |
| <b>6</b> | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                       | <b>267</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>270</b> |
| <b>8</b> | <b>ANHANG .....</b>  | <b>290</b> |
| <b>9</b> | <b>ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGKEIT .....</b>                              | <b>296</b> |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Johanniskraut in der Geschichte

Das Johanniskraut ist eine Pflanze, welche die Menschen schon sehr lange begleitet. So geht der Gattungsname *Hypericum* vermutlich auf die alten Griechen (bis 146 v. Chr.) zurück und setzt sich aus den beiden griechischen Begriffen „hyper“ (über) und „eikon“ (Bild) zusammen. Diese bezeichneten damit Pflanzen, die über religiöse Figuren gehängt wurden, um sie vor bösen Geistern zu bewahren (Robson 1977; Czygan 2003).

Die ersten Hinweise zur Verwendung als Heilpflanze finden sich in der „*Naturgeschichte*“ (*Historia Naturalis*) des römischen Naturforschers Plinius des Älteren (23 - 79 n.Chr.). Im 80. Kapitel, im 26. Buch steht:

„Verbrennungen werden durch den Wegerich geheilt ... ferner ... durch das bloße Kraut hyper-eikon, das wir corisum genannt haben“ (König und Winkler 1983)

Auch die Universalgelehrte Hildegard von Bingen (1098 - 1179) erwähnt in ihrem ersten Buch „*Physica*“ Johanniskraut, kann ihm jedoch keine heilende Wirkung abgewinnen.

„Es taugt für das Vieh. Für die Medizin taugt es nicht viel, weil es ein verwildertes und vernachlässigtes Kräutlein ist“ (von Bingen 1991)

Die frühzeitliche Verwendung als Apotropaikum spiegelt sich später sowohl in der deutschen als auch in der englischen Bezeichnung der Pflanze „*Johanniskraut*“ bzw. „*St. John's Wort*“ wider. Bezug wird dabei auf den Heiligen Johannes den Täufer, dem die Pflanze geweiht ist, genommen. Dessen Geburtstag am 24. Juni steht in enger Verbindung mit dem längsten Tag des Jahres und damit der Sommersonnenwende. In vielen Gebieten ist es Brauch in dieser kürzesten Nacht des Jahres das sogenannte Johannisfeuer zu entzünden. Dadurch sollen Dämonen, welche Krankheiten, Viehschäden oder behinderte Kinder verursachen, verscheucht werden. Das Johanniskraut stellt wohl die bekannteste Mittsommerpflanze dar. Sie blüht um den Johannistag auf und verkörpert mit ihrer Blüte die Krone eines Königs. Ihre zahlreichen Staubblätter gleichen den Sonnenstrahlen und der beim Zerreiben austretende rote Pflanzensaft symbolisiert das Blut des heiligen Johannes. Ob in Sträußen oder zum Kranz gebunden, Johanneskraut findet zur Sommersonnenwende auf vielerlei Art Verwendung. (Czygan 2003)

Die Wirkung des Johanniskrauts auf die Psyche der Menschen rückte erst ab dem Mittelalter in den Fokus und verschaffte ihm den Beinamen „*fuga daemonum*“ (Ernst 2003). Im Volksmund etablierten sich Namen wie *Jageteufel*, *Teufelsflucht*, *Walpurgiskraut* und *Hexenkraut*. Der Sage

nach gehen die durchscheinenden Löcher auf den Blättern der Pflanze auf den Teufel zurück. Dieser soll aufgrund der Macht des Krautes gegen böse Geister und auch gegen ihn in Rage geraten sein und die Blätter zerstoichen haben (Czygan 2003).

Der bekannte Arzt Paracelsus (1493 - 1541) war ein großer Anhänger des Johanniskrauts und widmete ihm in seinem Buch „*Von den natürlichen Dingen*“ (1525) ein eigenes Kapitel. In diesem beschreibt er den Einsatz der Heilpflanze bei verzweifelten Menschen.

Mit dem Siegeszug der naturwissenschaftlich orientierten Medizin rückte der therapeutische Einsatz des Johanniskrauts im 19. Jahrhundert immer mehr in den Hintergrund. Erst in den letzten Jahrzehnten kam es zur Renaissance der Heilpflanze. So wurde eine Herstellungsvorschrift für das so genannte „Rotöl“ 1941 ins Ergänzungsbuch des 6. Deutschen Arzneibuchs (DAB 6) aufgenommen. Seit 1979 findet sich das Johanniskraut im Deutschen Arzneimittel Codex und wird bei leichten Depressionen eingesetzt. Ins Europäische Arzneibuch hielt es im Jahr 2000 Einzug (Ph. Eur. 3 NT 2000). Obwohl etwa 450 *Hypericum*-Arten bekannt sind, wird als Stammpflanze nur *H. perforatum* L., das Tüpfel-Johanniskraut, oft auch als Echtes Johanniskraut bezeichnet, aufgeführt. Die Anwendung von Johanniskraut bei leichten bis mittelschweren Depressionen wird von der ESCOP positiv bewertet. Auch die Kommission E bewertet die medizinische Anwendung von Johanniskraut bei depressiven Verstimmungen und nervöser Unruhe, aber auch bei kleinen Wunden, Muskelschmerzen und Verbrennungen 1. Grades positiv. Das Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) ordnet verschiedene Trockenextrakte von *H. perforatum* der Kategorie „well-established medicinal use“ zu, wohingegen flüssige Zubereitungen als traditionelles pflanzliches Arzneimittel („traditional use“) eingestuft werden.

Verwendung findet es hauptsächlich in Form standardisierter Extrakte in Fertigarzneimitteln zur Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen. Als wirksamkeits-relevante Inhaltsstoffe gelten dabei das Acylphloroglucinol Hyperforin, das Naphtodianthron Hypericin sowie Flavonoide und Gerbstoffe. Sowohl Hypericin, als auch die Flavonoide aus *H. perforatum* zeigen antidepressive Aktivität im sogenannten „forced swimming test“ (Butterweck et al 1998, 2000). Muller et al berichten 1997 von der Hemmung der synaptischen Wiederaufnahme der Monoamine Serotonin, Dopamin und Noradrenalin *in vitro* durch Johanniskraut-Extrakte, wobei diese Wirkung maßgeblich dem Hyperforin zugeschrieben wird (Chatterjee et al 1998a, 1998b, Gobbi et al. 1999, Muller et al 1998). Anders als die klassischen antidepressiven Reuptake-Hemmer werden durch Hyperforin nicht die Monoamin-Transporterproteine blockiert (Mennini und Gobbi 2004), sondern vielmehr die intrazelluläre H<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Konzentration verändert (Singer et al 1999). Des Weiteren

kommt es zur Änderung in der Speicherung der Neurotransmitter in den synaptischen Vesikeln (Gobbi et al 1999, Roz et al 2002, Roz und Rehavi 2003). Seit 01. April 2009 sind Johanniskrautpräparate, sofern sie zur Behandlung mittelschwerer Depressionen zugelassen sind, in einer Dosierung von mindestens 300 mg hydroalkoholischer Extrakt je Applikationsform verschreibungspflichtig. In einem Cochrane-Review wurden 2008 29 Studien mit 5489 Patienten nochmals betrachtet und bestätigten die Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten bei leichten bis mittelschweren Depressionen. Dabei waren Extrakte der Heilpflanze besser wirksam als Placebo und vergleichbar wirksam wie chemisch-synthetische Antidepressiva (Linde et al. 2008). 2016 fasste ein Forscherteam um Eric Apaydin in einer Metaanalyse nochmals 35 randomisierte kontrollierte Studien mit insgesamt rund 7000 Teilnehmern zusammen. Die Patienten wurden entweder mit einem standardisierten Johanniskraut-Extrakt mit 0,3 % Hypericin und 1 - 4 % Hyperforin oder mit Placebo oder Antidepressiva behandelt. Analog dem Cochrane-Review zeigte sich abermals die Wirksamkeit der pflanzlichen Alternative bei niedrigerer Nebenwirkungsrate im Vergleich zu herkömmlichen Antidepressiva (Apaydin et al. 2016).

## 1.2 Die Gattung *Hypericum* L.

Die Gattung *Hypericum* wird der Familie der Johanniskrautgewächse (Hypericaceae Juss.), auch als Hartheugewächse bezeichnet, zugeordnet. Diese wurde 1789 von Antoine Laurent de Jussieu in seinem Werk *Genera plantarum* aufgestellt. Lange Zeit bestand Uneinigkeit darüber, ob es sich dabei um eine eigenständige Familie oder um eine Unterfamilie (Hypericoideae) der Clusiaceae bzw. Guttiferae handelt (Robson 1977; Hoffmann 2003; Stevens 2007).

Die sogenannte Angiosperm Phylogeny Group (APG), eine Gruppe von Botanikern um Mark Chase, hat es sich zur Aufgabe gemacht die Phylogenie der Bedecktsamer zu erarbeiten. In ihrer ersten Klassifikation 1998 „*An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants*“ war die Familie der Hypericaceae noch nicht in der Ordnung der Malpighiales aufgeführt. Diese Tatsache änderte sich in der aktualisierten Version von 2003 „*An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and the families of flowering plants: APG II*“ (The Angiosperm Phylogeny Group 2003) und die Familie wurde neben der Clusiaceae in der Ordnung der Malpighiales eingeordnet. Zum Erhalt der klaren Trennung der beiden Familien in der dritten Publikation der APG trugen vor allem die Forschungsergebnisse von Wurdack und Davis (2009) bei. Mittels DNA-Sequenzanalyse konnte Monophylie für die Familie der Johanniskrautgewächse nachgewiesen werden, wohingegen sich für die Familie der Clusiaceae Polyphyly ergab. Auch

die Untersuchung der Sequenzdaten des *petD* Gruppe II Introns und des *petB-petD* Spacers bestätigte diese Annahme (Korotkova et al. 2009). Der Begriff Monophylie beschreibt die Abstammung einer Artengruppe von einer gemeinsamen Stammart, wohingegen sich bei der Polyphylie die Arten aus zwei oder mehreren nicht näher miteinander verwandten Stammarten entwickeln.

Somit wird die Familie der Hypericaceae heute als eigenständige Familie in der Ordnung der Malpighiales angesehen. Mit 39 Familien, über 700 Gattungen und etwa 16000 Arten stellt diese Ordnung eine der größten und vielfältigsten in der Klasse der Bedecktsamer (Magnoliopsida) dar (Wurdack und Davis 2009; Meseguer und Sanmartín 2012).

Neben *Hypericum* werden acht weitere Gattungen der Familie der Johanniskrautgewächse zugeordnet. Gemäß Stevens (2007) kann diese wiederum in drei Tribus unterteilt werden, die sich sowohl in der Behaarung, als auch den Samen und Früchten und dem Blütenaufbau teilweise deutlich voneinander unterscheiden.

- I. **Tribus Vismieae** CHOISY (1821)
  - 1. *Vismia* VAND.
  - 2. *Harungana* LAMARCK
- II. **Tribus Hypericeae** CHOISY (1821)
  - 3. *Hypericum* L.
  - 4. *Lianthus* N. ROBSON
  - 5. *Triadenum* RAF.
  - 6. *Thornea* BREEDLOVE & MCCLINTOCK
  - 7. *Santomasia* N. ROBSON
- III. **Tribus Cratoxyleae** BENTHAM & J. D. HOOKER (1862)
  - 8. *Cratoxylum* BLUME
  - 9. *Eliea* CAMBESS.

In **Tabelle 1** ist die systematische Einordnung der Gattung *Hypericum* L. in das Reich der Pflanzen dargestellt.

**Tabelle 1** Systematische Einordnung der Gattung *Hypericum* in das Reich der Pflanzen

| Sippe (=Taxon) | lat. Bezeichnung | dt. Bezeichnung |
|----------------|------------------|-----------------|
| Reich          | Plantae          | Pflanzen        |
| Abteilung      | Tracheophyta     | Gefäßpflanzen   |

## EINLEITUNG

Fortsetzung Tabelle 1

|                       |                              |                       |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| <b>Unterabteilung</b> | Spermatophytina              | Samenpflanzen         |
| <b>Klasse</b>         | Magnoliopsida                | Bedecktsamer          |
| <b>Unterklasse</b>    | Rosidae                      | Rosenähnliche         |
| <b>Ordnung</b>        | Malpighiales                 | Malpighienartige      |
| <b>Familie</b>        | Hypericaceae JUSSIEU, 1789   | Johanniskrautgewächse |
| <b>Tribus</b>         | Hypericeae CHOISY, 1821      |                       |
| <b>Gattung</b>        | <i>Hypericum</i> LINNÉ, 1753 | Johanniskräuter       |

Die Gattung *Hypericum* L. gehört dabei mit vier weiteren Gattungen dem Tribus Hypericeae CHOISY an und vereint mit über 450 bekannten Arten etwa 80 % der Artenvielfalt der Familie auf sich (Crockett und Robson 2011). Viele der Arten sind schon lange bekannt und wurden teilweise schon in der vorchristlichen Zeit erwähnt (Ernst 2003), aber auch heute werden immer noch neue entdeckt und beschrieben (Ely et al. 2015). Aufgrund der mannigfaltigen Wuchsform, die von einjährigen Kräutern über mehrjährige Stauden, Halbsträucher und Sträucher bis hin zu Bäumen reicht (Robson 1977), ist *Hypericum* L. eine ubiquitär vorkommende Gattung, die bislang nur für sehr extreme Gebiete, wie Wüstenregionen und der Arktis bzw. Antarktis noch nicht beschrieben wurde (Schütt und Schulz 2007).

Seit Einführung der binären Nomenklatur für Pflanzennamen durch den schwedischen Naturforscher Carl von Linné (1707 - 1778) in seinem Werk *Species Plantarum* (1753), gab es zahlreiche Versuche die Vielzahl der in der Gattung *Hypericum* L. zusammengefassten Arten weiter zu klassifizieren. Zur Verfügung stehen hierfür hierarchische Ränge wie Untergattung, Sektion, Untersektion, Serie und Unterserie (Erhardt et al. 2014). Vereinheitlicht wurden die zum Teil sehr unterschiedlichen Klassifizierungsansätze durch Norman Keith Bonner Robson (\* 1928), einem englischen Botaniker, welcher die Arten anhand von morphologischen, geographischen und phylogenetischen Aspekten ordnete (Robson 1977). Von 1981 bis 2013 veröffentlichte er neun Studien, in denen er auf einzigartige Art und Weise die Sektionen und 458 Arten beschreibt.

Dass die systematische Einordnung der *Hypericum*-Arten aufgrund neugewonnener Erkenntnisse ein dynamischer Prozess ist, ist vor allem daran zu erkennen, dass die ursprünglichen 30 Sektionen (Robson 1977) bis heute um sechs zusätzliche (6a und 9a-e) und zahlreiche Untersektionen und Serien erweitert wurden. In **Tabelle 2** sind die derzeitigen 36 Sektionen mit der Anzahl ihrer Arten und dem Verbreitungsgebiet aufgeführt.

**Tabelle 2** Übersicht über die Sektionen der Gattung *Hypericum* mit der Anzahl der vereinten Arten und dem Verbreitungsgebiet nach (Crockett und Robson 2011); \* Sektionen, welche Untersektionen aufweisen, \*\* Sektionen, die sowohl Untersektionen, als auch Serien beinhalten

|    | <b>Sektion</b>              | <b>Anzahl der Arten</b> | <b>Verbreitung</b>  |
|----|-----------------------------|-------------------------|---|
| 1  | <i>Campylosporus</i>        | 10                      | Tropisches- und SO Afrika mit angrenzenden Inseln, SW Iran              |
| 2  | <i>Psorophytum</i>          | 1                       | Spanien (Balearen)  |
| 3  | <i>Ascyreia</i>             | 43                      | SO Europa, von W bis SO Asien, S China                                  |
| 4  | <i>Takasagoya</i>           | 5                       | Japan (Ryukyu Inseln), Taiwan, Philippinen                              |
| 5  | <i>Androsaemum</i>          | 4                       | Makaronesien, von W & S Europa bis zum Iran, Saudi Arabien und Jemen    |
| 6  | <i>Inodora</i>              | 1                       | NO Türkei, Georgien   |
| 6a | <i>Umbraculoides</i>        | 1                       | Mexiko (Oaxaca)   |
| 7  | <i>Roscyna</i>              | 2                       | von Zentral- bis O Asien, NO Amerika                                    |
| 8  | <i>Bupleuroides</i>         | 1                       | NO Türkei, Georgien   |
| 9  | <i>Hypericum</i> **         | 42                      | Europa, NW Afrika, Asien, NW Amerika                                    |
| 9a | <i>Concinna</i>             | 1                       | USA (N Kalifornien)   |
| 9b | <i>Graveolentia</i>         | 9                       | SO Kanada, von der östl. USA bis Guatemala                              |
| 9c | <i>Sampsonia</i>            | 2                       | von NO Indien bis S Japan   |
| 9d | <i>Elodeoida</i>            | 5                       | O & SO Asien (von China bis Kaschmir)                                   |
| 9e | <i>Monoanthema</i>          | 7                       | O & SO Asien (von China bis Sri Lanka)                                  |
| 10 | <i>Olympia</i>              | 4                       | S Balkanhalbinsel, W Türkei, Ägäische Inseln                            |
| 11 | <i>Campylopus</i>           | 1                       | S Bulgarien, NO Griechenland, NW Türkei                                 |
| 12 | <i>Origanifolia</i>         | 13                      | Türkei, Georgien, Syrien  |
| 13 | <i>Drosocarpium</i>         | 11                      | Madeira, vom Mittelmeerraum bis W Kaukasus                              |
| 14 | <i>Oligostema</i>           | 6                       | Europa, Makaronesien, Mittelmeerraum                                    |
| 15 | <i>Thasia</i>               | 1                       | Griechenland, Bulgarien, Türkei   |
| 16 | <i>Crossophyllum</i>        | 3                       | N Ägäische Region, Türkei, Kaukasus                                     |
| 17 | <i>Hirtella</i> **          | 30                      | W Mittelmeerraum & von S Europa bis zum Altai                           |
| 18 | <b><i>Taeniocarpium</i></b> | <b>28</b>               | <b>Europa, vom Mittelmeerraum bis zum Iran &amp; Mongolei</b>           |
| 19 | <i>Coridium</i>             | 6                       | Mittelmeerraum, Alpen, Kaukasus   |
| 20 | <i>Myriandra</i> *          | 29                      | von O & Zentral Nordamerika bis Honduras, Bermuda und Karibische Inseln |



## EINLEITUNG

Fortsetzung Tabelle 2

|           |                        |    |  |
|-----------|------------------------|----|--|
| <b>21</b> | <i>Webbia</i>          | 1  | Kanaren, Madeira   |
| <b>22</b> | <i>Arthrophyllum</i>   | 5  | S Türkei, Syrien, Libanon  |
| <b>23</b> | <i>Triadenioides</i>   | 5  | S Türkei, Syrien, Libanon, Sokotra   |
| <b>24</b> | <i>Heterophylla</i>    | 1  | Türkei (NW & W-zentral Anatolien)  |
| <b>25</b> | <i>Adenotrias</i>      | 3  | von S Marokko bis zum Mittelmeerraum   |
| <b>26</b> | <i>Humifusoideum</i>   | 12 | Tropisches & S Afrika, Madagaskar, von SO bis O Asien                                      |
| <b>27</b> | <i>Adenosepalum*</i>   | 25 | Kanaren, Madeira, Europa, Afrika, SW Asien   |
| <b>28</b> | <i>Elodes</i>          | 1  | Azoren & W Europa  |
| <b>29</b> | <i>Brathys*</i>        | 87 | Zentral & S Amerika, Karibische Inseln, SO Kanada & östl. USA (von S bis Florida)          |
| <b>30</b> | <i>Trigynobrathys*</i> | 52 | von südl. Amerika bis S Kanada, von O bis SO Asien, Hawaii, Australien, Neuseeland, Afrika |

Während für die Einordnung der Arten bislang hauptsächlich makro- und mikroskopischen Aspekte ausschlaggebend waren (Schütt und Schulz 2007), rücken nun vor allem phylogenetische Untersuchungen in den Fokus. Analyse von Chloroplasten-DNA (cpDNA) und der Morphologie von genomischen DNA-Sequenzen, insbesondere der *internal transcribed spacer* (ITS) helfen die Phylogenie „im Kern“ zu entschlüsseln (Hazler Pilepić et al. 2010; Nürk et al. 2013). Die daraus gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Neuordnung des bestehenden Systems führen.

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Klassifizierung der zahlreichen *Hypericum*-Arten stellt die Chemotaxonomie dar (Frohne und Jensen 1998). Insbesondere die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe könnten dabei die Rolle der chemotaxonomischen Marker einnehmen (Crockett und Robson 2011). Nürk und Crockett (2011) untersuchten bereits *Hypericum*-Arten aus zwei Drittel der 36 Sektionen hinsichtlich ihrer Morphologie und einzelner Sekundärmetabolite.

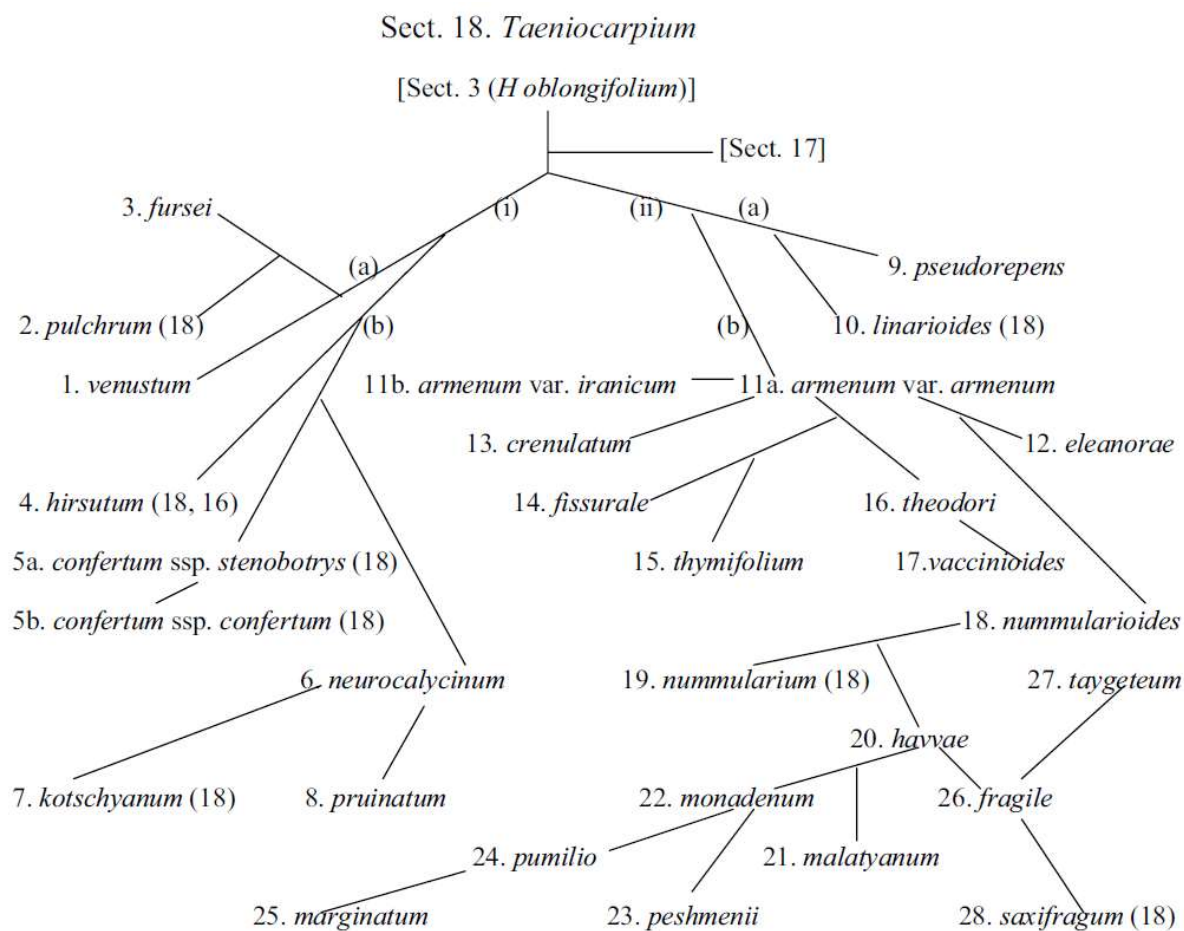
### 1.2.1 Sektion 18 *Taeniocarpium* JAUB. & SPACH

Die in dieser Arbeit untersuchte *Hypericum*-Art *H. hirsutum* ist mit 27 weiteren Arten der Sektion 18 *Taeniocarpium* JAUB. & SPACH zugeordnet. Die Sektion wurde bereits 1842 von den beiden französischen Botanikern Hippolyte François Jaubert (1798-1874) und Édouard Spach (1801-

1879) in ihrem gemeinsamen Werk „*Illustrationes plantarum orientalium*“ beschrieben. Die sogenannte „Hirtella-Gruppe“ umfasst diese Sektion und die beiden verwandten Sektionen 17 und 19 (*Hirtella*, 30 Arten und *Coridium*, 6 Arten). Die Vorfahren dieser Gruppe entstammen Sektion 3 *Ascyreia* (43 Arten), welche im süd- und ostasiatischen Raum sowie Südosteuropa beheimatet ist. Ein morphologisches Charakteristikum dieser drei Sektionen stellen die randständigen schwarzen Drüsen der Blüten dar. (Robson 2010)

In **Abbildung 1** ist die Abstammung der *Hypericum*-Arten innerhalb der Sektion 18 graphisch dargestellt. Es wird deutlich, dass die Arten 1 bis 8 eine Klade (i) und die Arten 9 bis 28 eine zweite Klade (ii) bilden. Diese unterscheiden sich zum einen in den Blättern, welche in der ersten Klade kaum gestielt sind, in der zweiten allerdings deutlich gestielt vorliegen, und zum anderen in der Behaarung. Während eine Subklade von Klade 1 (Arten 4 bis 8) behaart ist, fehlt die Behaarung der Pflanze bei den Arten der zweiten Klade gänzlich. (Robson 2010)

Die Verbreitung der Sektion erstreckt sich über die Türkei und den Kaukasus bis nach Westeuropa.



**Abbildung 1** Sektion 18 *Taeniocarpium*: Verhältnis zwischen den 28 Arten (Robson 2010)

### 1.2.2 *Hypericum hirsutum* L.

Die erste Beschreibung der Art *H. hirsutum* L. erfolgte wie die der Gattung *Hypericum* durch Carl von Linné in seiner Arbeit *Species Plantarum* 1753. Die Art-Bezeichnung *hirsutum*, das lateinische Adjektiv für rau bzw. behaart, lässt sich auf die dichte Behaarung des runden Stängels zurückführen, die so nur bei dieser *Hypericum*-Art zu finden ist. Sowohl die deutsche Bezeichnung behaartes Johanniskraut bzw. rauhaariges Hartheu, als auch die englische Übersetzung „hairy St. John’s Wort“ weisen ebenfalls auf dieses charakteristische Merkmal hin. Deutlich zu erkennen ist der behaarte Stängel in **Abbildung 2**.



**Abbildung 2** *H. hirsutum*, Detailansicht des Stängels und der gegenständigen Blätter; deutlich zu erkennen ist die dichte Behaarung des Stängels und der Blätter sowie die fehlenden schwarzen Drüsen an den Blättern

Es handelt sich dabei um eine ausdauernde, krautige Pflanze, die aufrecht wächst und bis 100 cm hoch werden kann. Die ovalen Blätter sind gegenständig angeordnet, wie der Stängel dicht behaart, durchscheinend punktiert und ohne schwarze Drüsen am Rand (**Abbildung 2**). *H. hirsutum* bildet einen rispigen Blütenstand aus. Die Kelchblätter der Blüte weisen, wie in **Abbildung 3** zu sehen ist, zahlreiche gestielte, schwarze Drüsen auf, die Naphthodianthrone enthalten. Diese sind für die Rotfärbung der Finger beim Zerreiben der Pflanzenteile verantwortlich. (Robson 2010)



**Abbildung 3** *H. hirsutum*, Detailansicht der Blüte mit deutlich erkennbaren schwarzen Drüsen vor allem auf den Kelchblättern

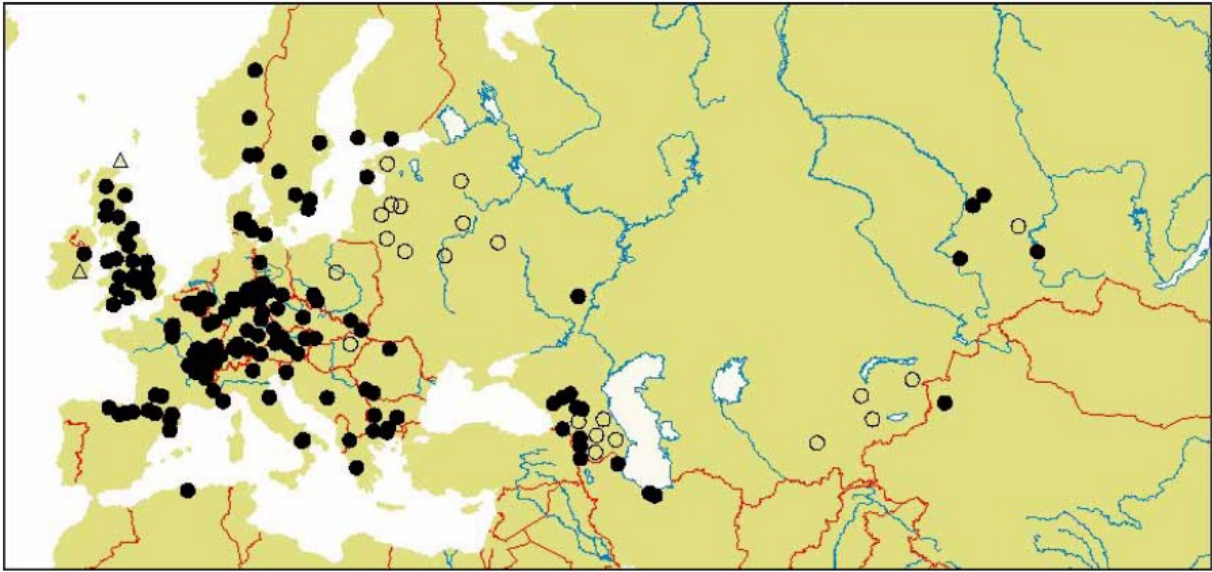
Eine besonders schöne Detailzeichnung ist im zehnten Teil des 28-bändigen Werkes (1800-1934) „*Flora Batava of Afbeelding en Beschrijving van Nederlandsche Gewassen*“ von 1849 zu finden (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4** Detailzeichnung von *H. hirsutum*; **a** Blüte, **b** Kronblatt, **c** Bündel Staubblätter mit zwei Kelchblättern, **d** Kelch, **e** Kelchblatt, **f** Fruchtknoten mit drei Staubblättern, **g** reife Fruchtkapsel, **h** Samen, **i** Blatt

Man findet die Pflanze vor allem an Waldlichtungen, Waldwegen und Flüssen sowie auf feuchten Böden. In Kalkgebieten ist sie sehr verbreitet, wohingegen sie auf sauren Böden nahezu gänzlich fehlt (Spohn 2015).





**Abbildung 5** Verbreitung von *H. hirsutum* ●, Aufzeichnungen ○, nicht mehr existierende Aufzeichnungen Δ (Robson 2010)

Auf der Karte in **Abbildung 5** ist die Verbreitung von *H. hirsutum* zu sehen. Die Verteilung konzentriert sich vor allem auf Mittel- und Westeuropa. Vereinzelt ist es auch in Nord- und Südeuropa sowie der Türkei und Kasachstan zu finden. (Robson 2010)

### 1.3 Acylphloroglucinole

Acylphloroglucinole werden als sekundäre Metabolite sowohl von Pflanzen als auch von marinen Lebensformen und Mikroorganismen gebildet (Pal Singh und Bharate 2006).

Von Lindequist (2012) werden Acylphloroglucinole folgendermaßen beschrieben:

*„Acylphloroglucinole sind Phloroglucinderivate, die am Benzenring einen ankondensierten Acylrest tragen, z. B. Acetyl-, Propionyl-, Butyryl-, Isobutyryl-, Valeryl-, Isovaleryl- oder 2-Methylbutyrylrest.“*

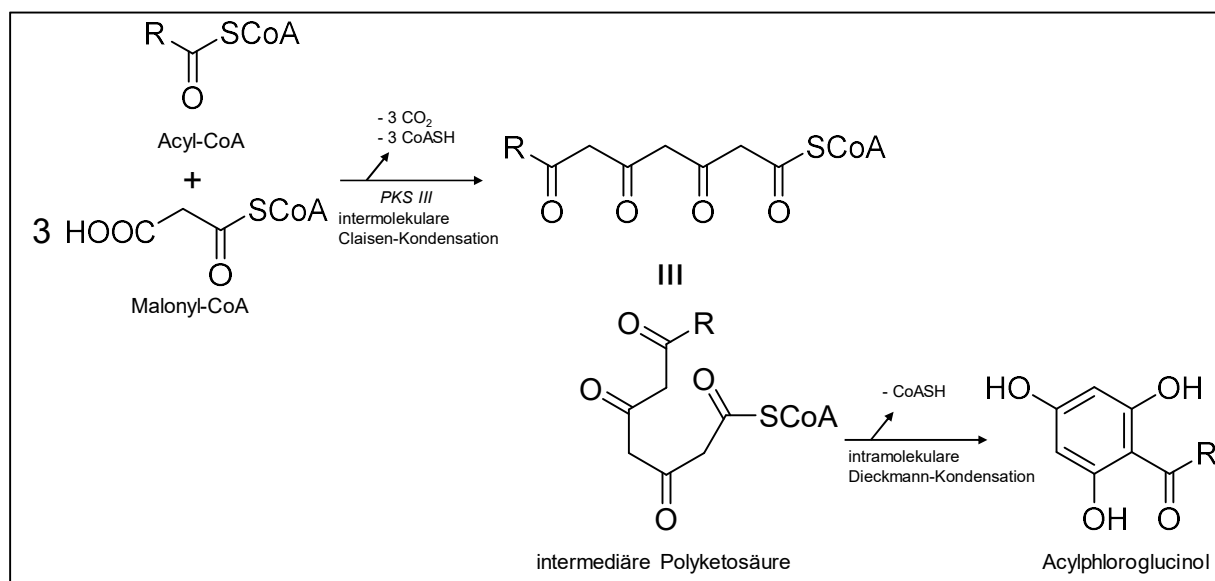
Bislang sind etwa 1000 Vertreter dieser äußerst heterogenen Substanzklasse bekannt von denen über 400 für die Gattung *Hypericum* beschrieben wurden (Pal Singh und Bharate 2006; Bridi et al. 2018).

#### 1.3.1 Biosynthese der Acylphloroglucinole

Da es sich bei Acylphloroglucinolen um Polyketide handelt, erfolgt deren Biogenese über den **Acetat-Malonat-Weg**. Hierfür reagiert das Starter-Molekül, eine durch die Bindung an Coenzym A aktivierte aliphatische oder aromatische Säure, mit ebenfalls aktivierten Extender-Molekülen, die in der Regel Malonyl-Coenzym A-Moleküle darstellen. Durch den Verlust von CO<sub>2</sub> und die Abspaltung von regeneriertem Coenzym A werden diese Malonyl-CoA-Bausteine als Acetyl-Einheiten an die Startersäure ankondensiert. Diese intermolekularen Claisen-Kondensationen werden durch das Enzym Polyketidsynthase Typ III (PKS III) katalysiert. Abgeschlossen wird die Acylphloroglucinol-Bildung durch eine intramolekulare Dieckmann-Kondensation, bei der es abermals zur Abspaltung von Coenzym A kommt (Lindequist 2012).

In **Abbildung 6** ist der Acetat-Malonat-Weg für die Biosynthese des Acylphloroglucinol-Grundkörpers nochmals schematisch dargestellt.



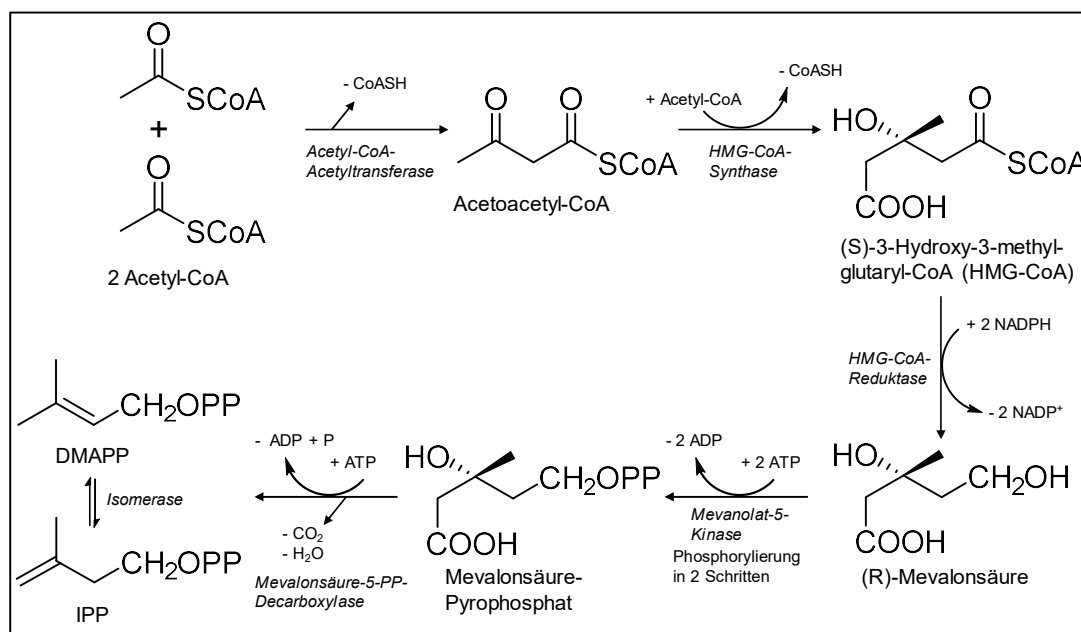


**Abbildung 6** Acetat-Malonat-Weg (Polyketidweg): Biosyntheseweg für den Grundkörper der Acylphloroglucinole

Der Mechanismus der Acylphloroglucinol-Biosynthese wurde in den 70er Jahren von den beiden deutschen Lebensmittelchemikern Friedrich Drawert und Johannes Beier anhand der Hopfenbitterstoffe, die die Acylphloroglucinol-Vertreter des Hopfens darstellen, ermittelt (Drawert und Beier 1974a, 1974b, 1976b, 1976a).

### 1.3.2 Strukturelle Vielfalt und Klassifizierung der Acylphloroglucinole

Die strukturelle Vielfalt der Substanzklasse ist auf die anschließende Substitution des Grundkörpers zurückzuführen. Dabei kommt es in der Gattung *Hypericum* hauptsächlich zur Verknüpfung von Prenyl- oder Geranylresten an Kohlenstoff- und/oder auch Sauerstoffatomen. Die Grundlage hierfür bildet die Synthese von reaktiven Isopreneinheiten über den **Acetat-Mevalonat-Weg (Abbildung 7)** (Qureshi und Porter 1981). In den Plastiden von Pflanzen, Protozoen, Bakterien und Algen kann Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) auch über den sogenannten Methylerythritolphosphat-Weg (MEP) zur Verfügung gestellt werden (hier nicht dargestellt) (Rohdich et al. 2002; Cordoba et al. 2009).

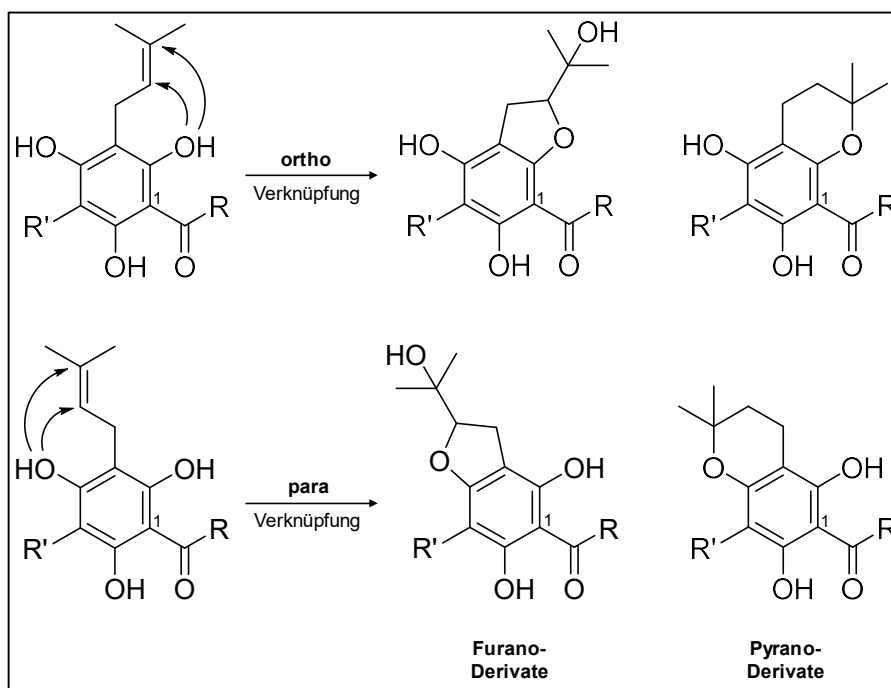


**Abbildung 7** Acetat-Mevalonat-Weg: Biosyntheseweg für die reaktiven Isopreneinheiten

Somit entsteht die Substanzklasse der Acylphloroglucinole über eine gemischte Biosynthese – der Grundkörper über den Acetat-Malonat-Weg und die Isoprensubstituenten über den Acetat-Mevalonat-Weg.

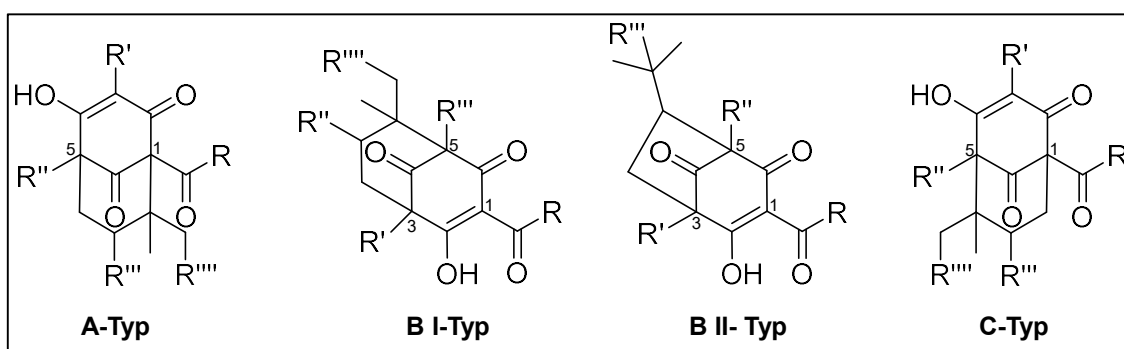
Durch Prenylierung bzw. Geranylierung des Phloroglucin-Grundkörpers entstehen monozyklische (poly)prenylierte Acylphloroglucinolderivate (**MPAPs**), die in C-prenylierte bzw. -geranylierte und O-prenylierte bzw. -geranylierte Acylphloroglucinole unterteilt werden können. Diese einfachen Acylphloroglucinole sind hauptsächlich für die Familien der Myrtaceae und Cannabaceae bekannt (Ciochina und Grossman 2006).

In den C-substituierten Acylphloroglucinolderivaten können intramolekulare Zyklisierungsreaktionen mit den Hydroxygruppen auftreten, wodurch es zur Bildung von bityklischen (poly)prenylierten Acylphloroglucinolen (**BPAPs**) kommt. Abhängig vom gebildeten Heterozyklus unterscheidet man zwischen Furano- und Pyrano-Derivaten. Des Weiteren ist eine Klassifizierung in *ortho*- und *para*-Abkömmlinge möglich, wobei die Position der in den Ring eingeschlossenen OH-Gruppe in Bezug zur Acylseitenkette entscheidend ist (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8** Bicyklische (poly)prenylierte Acylphloroglucinole vom **Furano-** oder **Pyrano-Typ** durch C-O-Bindung des Isoprensubstituenten und der Hydroxygruppe in *ortho*- oder *para*-Position zur Acylgruppe

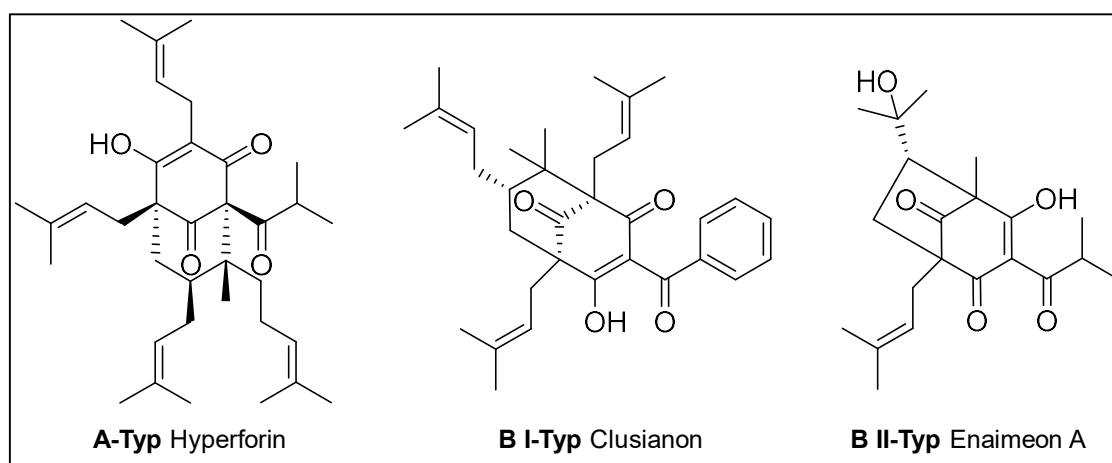
Die Bildung von bicyklischen Verbindungen ausgehend von einem C-substituierten Acylphloroglucinol ist auch über einen C-C-Ringschluss möglich. Wie in **Abbildung 9** zu sehen ist, können hier ebenfalls je nach Verknüpfung verschiedene Typen unterschieden werden (Cuesta-Rubio et al. 2001; Ciochina und Grossman 2006). Die dabei gebildeten bicyklischen Grundkörper werden als Unterklassen den polyzyklischen polyprenylierten Acylphloroglucinolen (**PPAPs**) zugeordnet (Ciochina und Grossman 2006; Dakanali und Theodorakis 2011).



**Abbildung 9** Bicyklische (poly)prenylierte Acylphloroglucinole vom **A-Typ**, **B I-** oder **B II-Typ** und dem **C-Typ** durch C-C-Bindung mit dem Phloroglucinring; die Verknüpfung erfolgt beim **A-Typ** von C-5→C-1, beim **B-I** und **B II-Typ** von C-3→C-5 bzw. C-5→C-3 und beim **C-Typ** von C-1→C-5

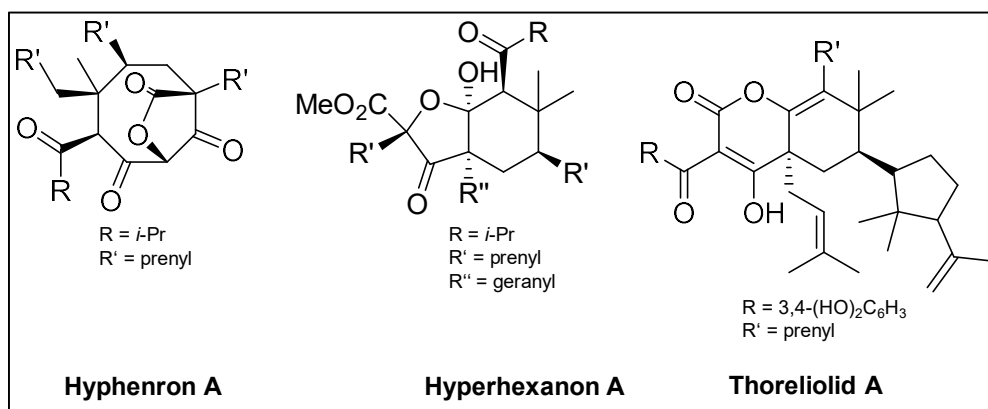
Für die Gattung *Hypericum* sind bislang nur Acylphloroglucinole des A-, B I- und B II- Typs bekannt (Yang et al. 2017b). Yang et al. (2018) beschreiben in ihrem Review 421 PPAPs natürlichen Ursprungs. Diese wurden bis auf wenige Ausnahmen von Pflanzen der Familien Clusiaceae und Hypericaceae, insbesondere der Gattungen *Hypericum* und *Garcinia*, isoliert. Interessant ist, dass fast 90 % der A-Typ BPAPs in der Gattung der Johanniskräuter zu finden sind, wohingegen die des B-Typs überwiegend aus *Garcinia*-Arten isoliert wurden. In der Arbeit von Yang et al. wird außerdem die Existenz der vierten Gruppe, den Acylphloroglucinolen vom C-Typ, gänzlich angezweifelt. So wurde die Struktur der ersten beschriebenen Vertreter **Nemoroson** und **Hydroxynemoroson** (de Oliveira et al. 1996) bereits 2001 (Cuesta-Rubio et al.) bzw. 2006 (Ciochina und Grossman) zum entsprechenden A-Typ-Acylphloroglucinol revidiert. Auch die für **7-*epi*-Nemoroson** angegebene Struktur (de Oliveira et al. 1999) wurde letztlich wenige Jahre später korrigiert (Bittrich et al. 2003). Die Berichtigung der verbleibenden C-Typ PPAPs **Garciniellipton K-M** (Weng et al. 2004) erfolgte schließlich 2017 durch die Arbeitsgruppe von Yang et al., sodass heute keine Verbindung vom besagten Typus mehr bekannt ist.

In **Abbildung 10** sind die bekanntesten der aus *Hypericum*-Arten isolierten Vertreter der jeweiligen Unterklasse dargestellt.



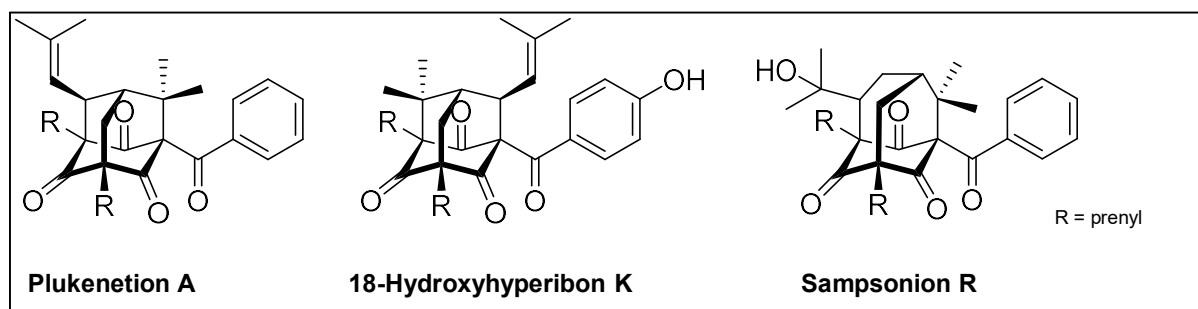
**Abbildung 10** Beispielverbindungen für BPAPs des **A-Typs** (Hyperforin, Gurevich et al. 1971), **B I-Typs** (Clusianon, Hu und Sim 2000) und **B II-Typs** (Enaimeon A, Winkelmann et al. 2001a)

Aus den bizyklischen Verbindungen können durch Aufspaltung einer C-C-Bindung sogenannte *seco*-BPAPs entstehen, deren Acylphloroglucinol-Grundgerüst nicht mehr auf den ersten Blick erkennbar ist (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11** Beispielverbindungen für seco-BPAPs: **Hyphenron A** 1,9-seco-BPAP vom A-Typ (Yang et al. 2014), **Hyperhexanon A** 1,2-seco-BPAP vom A-Typ (Zhu et al. 2016a) und **Thoreliolid A** 1,2-seco-BPAP vom B-Typ (Nguyen et al. 2016)

Durch zusätzliche Prenylierung der Grundkörper der BPAPs und weiterer Zyklisierungsschritte kann es zur Bildung der polyzyklischen polyprenylierten Acylphloroglucinole kommen. Bekannt sind komplexe Verbindungen mit einem Adamantan oder Homoadamantan-Grundgerüst. Die Isolierung von **Plukenetion A**, dem ersten Acylphloroglucinol vom Adamantan-Typ (Henry et al. 1996), war bahnbrechend, da davor davon ausgegangen wurde, dass lebende Organismen dieses Kohlenstoffskelett nicht herstellen können und die Biosynthese rein abiotisch ist (Wanka et al. 2013). Die Bildung dieser verschachtelten Verbindungen ist prinzipiell ausgehend von einem bicyklischen polyprenylierten Acylphloroglucinol sowohl vom A-Typ als auch vom B I-Typ möglich, jedoch ist bislang kein Homoadamantan-Vertreter, der sich vom B I-Typ ableitet, bekannt (**Abbildung 12**). Vergleichbar mit der Gruppe der bicyklischen Verbindungen kann es auch hier zu „Brüchen“ im Kohlenstoff-Grundgerüst und damit zu *seco*-Derivaten kommen.



**Abbildung 12** Beispielverbindungen für PPAPs vom Adamantan-Typ ausgehend von einem A-Typ BPAP **Plukenetion A** (Henry et al. 1996) und von einem B I-Typ BPAP **18-Hydroxyhyperibon K** (Christian et al. 2008) sowie das PPAP vom Homoadamantan-Typ ausgehend von einem A-Typ BPAP **Sampsonion R** (Xiao et al. 2007)

Die Oxidation zusätzlicher Isoprenreste, eine Verschiebung der Doppelbindung in Isoprensubstituenten, vielfältige Zyklisierungsmöglichkeiten zwischen zwei Isopreneinheiten oder auch bei den Prenylsubstituenten und dem Benzenring erhöhen die Strukturdiversität um ein Vielfaches.

## 1.4 Zielsetzung

### 1.4.1 Isolierung von Acylphloroglucinolen aus *Hypericum hirsutum* L.

Die phytochemische Untersuchung der in Deutschland heimischen *Hypericum*-Art *H. hirsutum* scheint interessant, da das Inhaltsstoffspektrum, insbesondere die in dieser Gattung weit verbreiteten Acylphloroglucinole weitestgehend unerforscht sind. Auch zu den anderen Vertretern der in Sektion 18 *Taeniocarpium* zusammengefassten Arten lässt sich bislang kaum etwas in der wissenschaftlichen Literatur finden, sodass die chemotaxonomische Einordnung dieser Sektion in die Gattung *Hypericum* noch nicht möglich ist.

Der Petrolether-Extrakt aus den oberirdischen Teilen von *H. hirsutum* sollte mithilfe unterschiedlicher chromatographischer Methoden so bearbeitet werden, dass möglichst viele lipophile Sekundärmetabolite aus der Klasse der Acylphloroglucinole isoliert werden können.

Die Struktur der isolierten Verbindungen sollte mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie aufgeklärt und ihr physiko-chemisches Verhalten mithilfe von optischen und spektroskopischen Analysemethoden wie Polarimetrie, Zirkulardichroismus und UV-Vis-Spektroskopie charakterisiert werden.

### 1.4.2 Zellbiologische Testung ausgewählter Substanzen

Aufgrund der immensen Strukturvielfalt der Substanzklasse sind sehr viele unterschiedliche biologische *in vitro* Aktivitäten für Acylphloroglucinole beschrieben.

In dieser Arbeit sollten Vertreter der isolierten Verbindungen auf ihre Aktivität in Bezug auf die Hemmung der Angiogenese, die Inhibition verschiedener Prozesse in der Entzündungskaskade und auf Protektion der Nervenzellen vor den toxischen Einflüssen des endogenen Botenstoffs Glutamat untersucht werden. Verglichen werden sollten die Ergebnisse mit der Aktivität des wohl prominentesten Acylphloroglucinol-Derivats, dem Hyperforin.

## 2 ISOLIERUNG

### 2.1 Material und Methoden

Sowohl bei der Fraktionierung des Pflanzenextraktes, als auch bei der Isolierung von Reinsubstanzen und deren Charakterisierung, insbesondere der Strukturaufklärung fanden zahlreiche Geräte, Glasgeräte, Softwareprogramme als auch Chemikalien und Lösungsmittel Verwendung. Allgemeine Geräte, Gefäße und Software sind in **Tabelle 3** aufgeführt, wohingegen die für einzelne Arbeitsschritte benötigten Geräte, Gefäße, Software, Chemikalien und Lösungsmittel in den jeweiligen Kapiteln zu finden sind.

#### 2.1.1 Allgemeine Geräte, Gefäße und Software

**Tabelle 3** Auflistung der Geräte, Gefäße und Software

|                            | Modell   | Hersteller  |
|----------------------------|--|---|
| <b>Analysenwaage</b>       | R 160 P  | Sartorius,<br>Göttingen (DE)                            |
| <b>Einmalspritzen</b>      | Norm-Ject, Tuberculin,<br>1 mL                   | Henke Sass Wolf,<br>Tuttlingen (DE)                     |
| <b>Diverse Glasgeräte</b>  | Mess- und Vollpipetten<br>verschiedener Volumina | Brand,<br>Wertheim (DE)                                 |
|                            | Messkolben<br>5, 10 und 25 mL                    |   |
|                            | Messzylinder<br>100 - 1000 mL                    |   |
|                            | Rundkolben<br>25 - 1000 mL                       |   |
| <b>Oberschalenwaage</b>    | MC 1, Laboratory LC 6200 S                       | Sartorius,<br>Göttingen (DE)                            |
| <b>Reinstwasseranlage</b>  | Astacus LS                                       | MembraPure,<br>Berlin (DE)                              |
| <b>Rotationsverdampfer</b> | Laborota 4003 control                            | Heidolph Instruments GmbH &<br>Co.KG,<br>Schwabach (DE) |
| <b>Ultraschallbad</b>      | Ultrasonic cleaner                               | VWR,<br>Darmstadt (DE)                                  |



Fortsetzung Tabelle 3

|                        |  |  |
|------------------------|--|--|
| <b>Zeichenprogramm</b> | ChemBioDraw Ultra<br>14.0.0.117        | PerkinElmer Inc.,<br>Waltham (US)            |
| <b>Zentrifuge</b>      | Jouan BR4i multifunction<br>centrifuge | Thermo Electron Corporation,<br>Waltham (US) |

### 2.1.2 Pflanzenmaterial und Extraktion

Die blühenden, oberirdischen Pflanzenteile von *Hypericum hirsutum* L. wurden im Juli 2013 von Herrn Dr. Sebastian Schmidt, Herrn Dr. Stefan Wiesneth und Herrn Markus Löhr entlang einem Waldweg in der Gemeinde Biebelried im unterfränkischen Landkreis Kitzingen (49° 43' 52,352 N, 10° 3' 23,050 O) gesammelt und identifiziert. Ein Rückstellmuster ist an der Universität Regensburg am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie mit der Identifikationsnummer „2“ hinterlegt.

Die luftgetrockneten und pulverisierten oberirdischen Teile von *H. hirsutum* L. (570 g) wurden dankenswerterweise von Frau Katharina Krautbauer im Rahmen ihres Wahlpflichtpraktikums mittels fraktionierter Perkolation extrahiert. Die Fraktionierung erfolgte in steigender Hydrophilie der Extraktionsmittel mit Petrolether (PE), Dichlormethan (DCM), Ethylacetat (EtOAc) und 80%igem Methanol (MeOH 80 %). Es wurden 19,0 g der Petrolether-Fraktion zur Weiterverarbeitung erhalten.

### 2.1.3 Fraktionierung und Isolierung

#### 2.1.3.1 Fraktionskontrolle

Um nach den einzelnen Fraktionierungsschritten entscheiden zu können, welche Reagenzgläser zu Fraktionen vereinigt werden sollen, war die Anfertigung von Dünnschichtchromatogrammen (DCs) unerlässlich. Außerdem wird mithilfe eines abschließenden Übersichts-DCs der erhaltenen Fraktionen, zusammen mit den dazugehörigen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren deutlich, welche Fraktionen von Interesse sind und künftig weiterbearbeitet werden sollen.

### 2.1.3.1.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde vor allem verwendet, um das Ergebnis der Fraktionierung auswerten zu können. Hierzu wurden in der Regel 10 - 20 µL Probelösung aus jedem zweiten Reagenzglas mittels Mikropipette entnommen und auf eine DC-Platte (**Tabelle 4**) aufgetragen.

Nach Abschluss jedes Fraktionierungsschrittes wurde ein Übersichts-DC über die neuen Fraktionen erstellt. Die einzelnen Fraktionen wurden einrotiert, in tarierte Schnappdeckelgläser überführt, unter Stickstoff getrocknet und anschließend gewogen. 10 - 20 µL der auf 10 mg/mL konzentrierten Lösung der Fraktionen wurden mittels Linomat 5 (**Tabelle 4**) bandenförmig auf eine Kieselgelplatte gesprüht (Sprühgeschwindigkeit 150 nL/s, Sprühgas Luft).

Die nach der Isolierung an der semi-präparativen HPLC erhaltenen Reinsubstanzen wurden in der Konzentration 1 mg/mL, die restliche Fraktion in 5 mg/mL gelöst. 10 µL dieser Verdünnungen wurden als 0,8 cm lange Bande mit einem 1 cm breiten Abstand vom Plattenboden mithilfe des Linomaten auf die DC-Platte gesprüht (Sprühgeschwindigkeit 150 nL/s, Sprühgas Luft).

**Tabelle 4** Materialien für die Dünnschichtchromatographie

|                      | Modell  | Hersteller                                |
|----------------------|---|---|
| <b>DC-Gerät</b>      | Linomat 5 (Auftragung)  | Camag,<br>Muttentz (CH)                   |
|                      | Reprostar 3 (Dokumentation)                                       |   |
|                      | WinCats 1.4.2 (Software)  |   |
|                      | Probendosierspritze<br>100 µL                                     | Hamilton Bonaduz AG,<br>Bonaduz (CH)      |
| <b>DC-Platten</b>    | TLC Silica gel 60 F <sub>254</sub> Aluminium-<br>folie 20 x 20 cm | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)   |
| <b>Mikropipetten</b> | Blaubrand® intraMARK<br>(5, 10 und 20 µl)                         | Brand,<br>Wertheim (DE)                   |
| <b>DC-Kammer</b>     | Flachbodenkammer<br>(20 x 20 cm)                                  | Desaga Sarstedt-Gruppe,<br>Nümbrecht (DE) |
| <b>Heizplatte</b>    | Thermoplate S   | Desaga Sarstedt-Gruppe,<br>Nümbrecht (DE) |

## ISOLIERUNG

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte in Flachbodenkammern, in die bereits etwa 20 Minuten vor der Entwicklung das Fließmittel (**Tabelle 5**) zusammen mit einem Filterpapier gegeben wurde, um eine ausreichend fließmittelgesättigte Atmosphäre sicherzustellen. Nach einer Laufstrecke von 8 cm wurden die Platten entnommen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrockneten Platten wurden zunächst underivatisiert bei 254 und 366 nm sowie bei Tageslicht betrachtet und dokumentiert. Im Anschluss wurden diese gleichmäßig mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (**Tabelle 5**) besprüht und 5 - 10 Minuten bei etwa 105 °C auf einer Heizplatte, bis zur vollständigen Farbentwicklung der Banden, getrocknet. Die Dokumentation der derivatisierten Chromatogramme erfolgte bei 366 nm und Tageslicht.

**Tabelle 5** Fließmittel und Sprühreagenz für die Dünnschichtchromatographie sowie die dazu verwendeten Lösungsmittel

|  | Zusammensetzung   | Volumen-Teile   |
|--|---|---|
| <b>Fließmittel</b>   | <i>n</i> -Hexan:EtOAc:Ameisensäure  | 65:33:2   |
|  | Bestandteile  | Volumen   |
| <b>Anisaldehyd-Schwefelsäure (AAS)-Reagenz</b><br>(Sprühreagenz) | Anisaldehyd   | 0,5 mL  |
|  | Essigsäure  | 10 mL   |
|  | Methanol  | 85 mL   |
|  | Schwefelsäure   | 5 mL  |
|  | 0,5 mL Anisaldehyd werden in 10 mL Essigsäure gelöst. Anschließend werden 85 mL Methanol hinzugefügt. Dem eiskühlten Ansatz werden zuletzt 5 mL Schwefelsäure zugeträufelt. |   |
|  | Spezifizierung/Qualität   | Hersteller  |
| <b>Ameisensäure</b>  | 98-100 %, p.a.  | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                           |
| <b>Anisaldehyd</b>   | <i>p</i> -Methoxybenzaldehyd,<br>zur Synthese   | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                           |
| <b>Essigsäure</b>  | 100 %, anhydrous  | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                           |
| <b>Ethylacetat</b>   | p.a.  | Acros Organics, über Thermo<br>Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b>Methanol</b>  | p.a. (EMSURE®)  | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                           |

Fortsetzung Tabelle 5

|                       |               |   |
|-----------------------|---------------|---|
| <b><i>n</i>-Hexan</b> | p.a.          | Acros Organics, über Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) |
| <b>Schwefelsäure</b>  | 95-97 %, p.a. | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt (DE)                        |

### 2.1.3.1.2 <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Für die Fraktionskontrolle wurde von allen gewonnenen Fraktionen ein Protonenspektrum bei einer Resonanzfrequenz von 300,13 MHz und Raumtemperatur aufgenommen und die Spektren mittels Topspin® verarbeitet. Hierfür wurden etwa 10 mg jeder Fraktion in deuteriertem Chloroform (CDCl<sub>3</sub>) gelöst und in ein NMR-Röhrchen überführt (**Tabelle 6**).

**Tabelle 6** Materialien, Software und Lösungsmittel für die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

|                               | <b>Modell</b>                    | <b>Hersteller</b>                  |
|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| <b>NMR-Spektrometer</b>       | AVANCE 300                       | Bruker Corporation, Billerica (US) |
| <b>NMR-Röhrchen</b>           | 507-HP-8                         | Norell, Landsville (US)            |
| <b>NMR-Software</b>           | Topspin® 3.2                     | Bruker Corporation, Billerica (US) |
|                               | <b>Spezifizierung/Qualität</b>   | <b>Hersteller</b>                  |
| <b>Chloroform, deuteriert</b> | Chloroform d <sub>1</sub> 99,8 % | Deutero, Kastellaun (DE)           |

### 2.1.3.2 Säulenchromatographie an Diaion® HP-20

Um den lipophilen Petrolether-Extrakt zu entfetten und das enthaltene Chlorophyll zu entfernen, wurde offene Säulenchromatographie mit Diaion® HP-20 Material durchgeführt (**Tabelle 7**). Das Verhältnis von Extrakt zu stationärer Phase betrug 1:10.

Zunächst wurde in eine Säule Watte gefüllt, damit das Säulenmaterial nicht auslaufen kann. Danach wurden 8 Teile Diaion® HP-20 (127,8 g) mit Methanol 100 % aufgeschlämmt und in die

## ISOLIERUNG

Säule gegeben. Unter vorsichtigem Klopfen der Säule und leichtem Öffnen des Hahnes bildete sich ein homogenes Säulenbett ohne Luft einschüsse. Anschließend wurde die Säule mit dem zweifachen Säulenvolumen (1360 mL) an Methanol 90 % (V/V) äquilibriert. Für die Probenaufgabe wurde der Pflanzenextrakt in etwas Dichlormethan gelöst und mit 2 Teilen stationärer Phase (31,8 g) versetzt. Nachdem das Lösungsmittel mithilfe des Rotationsverdampfers entfernt wurde, konnte die Probe trocken auf die Säule gegeben werden.

Zunächst wurde mit 3,2 L Methanol 90 % (V/V) eluiert, anschließend mit 16,0 L Methanol 100 %. Erst bei der Elution mit 3,4 L Dichlormethan wurde das Chlorophyll von dem Adsorptionsmaterial gelöst und ausgespült. Mit 1,0 L Petrolether wurde das Säulenmaterial gesäubert. Die erhaltenen Fraktionen **PE.1** bis **PE.4** wurden in tarierte Rundkolben überführt, am Rotationsverdampfer getrocknet und anschließend in etwas Wasser suspendiert. Nach dem Einfrieren der Fraktionen, konnten diese lyophilisiert und anschließend ausgewogen werden.

**Tabelle 7** Charakterisierung der selbstgepackten, offenen Säule mit Diaion®HP-20 Material sowie verwendete Lösungsmittel

|  | Maße                                | Menge stationäre Phase   |
|--|-------------------------------------|--|
| <b>Säule</b>   | Ø = 6,5 cm, l = 20,5 cm, V = 680 mL | 159,6 g  |
|  | Spezifizierung/Qualität             | Hersteller   |
| <b>Diaion® HP-20</b>   | Partikelgröße: 250 - 850 µm         | Supelco,<br>Bellefonte (US)                                    |
| Bei Diaion® HP-20 handelt es sich um ein hochporöses Polymerharz, das eine sehr große Oberfläche besitzt. Die synthetisch hergestellte Polystyrol/Divinylbenzol-Matrix eignet sich gut zum Entfernen von lipophilen Bestandteilen wie Lipiden, Fettsäuren, Chlorophyll und Wachse. Das Prinzip der Adsorption basiert auf der Ausbildung von Van-der-Waals-Kräften zwischen den Harzpartikeln und den nicht-polaren Bestandteilen (Ozaki et al. 2012). |                                     |  |
|  | Spezifizierung/Qualität             | Hersteller   |
| <b>Dichlormethan</b>   | p.a.                                | Acros Organics, über Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b>Methanol</b>  | p.a. (EMSURE ®)                     | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                        |
| <b>Petrolether</b>   | p.a.                                | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                        |

Fortsetzung Tabelle 7

|                         | Modell | Hersteller  |
|-------------------------|--------|---|
| <b>Gefriertrocknung</b> | P10-85 | Dieter Piatkowski-Forschungsgeräte,<br>München (DE) |

### 2.1.3.3 Flash-Chromatographie

Die Fraktionen **PE.1** und **PE.2** wurden einer groben Fraktionierung am Flash-Automaten (**Tabelle 8**) mit einer vorgepackten Kieselgelsäule (S1, **Tabelle 9**) unterzogen. Um eine gleichmäßige Chromatographie zu erreichen, wurde die Säule zunächst mit den Startbedingungen des Gradienten etwa 30 Minuten äquilibriert.

**Tabelle 8** Flash-Automat zur groben Fraktionierung von **PE.1**, **PE.2** und **PE.2.3.2**

|                      | Modell                             | Hersteller                          |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Flash-Automat</b> | Spot Liquid Chromatography Flash   | Armen Instrument,<br>Saint-Ave (FR) |
|                      | Armen Glider Flash V2.3 (Software) |                                     |

Die Aufgabe der Probe erfolgte analog der Diaion® HP-20 Säule als trockenes Pulver direkt auf das Säulenbett. Hierfür wurden die Fraktionen in *n*-Hexan gelöst, mit etwa der doppelten Menge an Kieselgel versetzt und am Rotationsverdampfer getrocknet.

Die Ausbeute für Fraktion **PE.2.3.2** war für eine abschließende Aufreinigung an der semi-präparativen HPLC zu umfangreich und enthielt zahlreiche Verbindungen, sodass ein zusätzlicher Fraktionierungsschritt an RP18-Material am Flash-Automaten durchgeführt wurde. Verwendung fand eine bereits gepackte Säule (S2, **Tabelle 9**), die mit Startbedingungen ausreichend lange eingespült wurde. Die Probe wurde in Acetonitril 90 % gelöst und flüssig auf die Säule gegeben.

## ISOLIERUNG

**Tabelle 9** Übersicht über die verwendeten Trennsäulen für Flash-Chromatographie

|                         | Stationäre Phase | Bezeichnung          | Inhalt                             | Partikelgröße | Hersteller                                 |
|-------------------------|------------------|----------------------|------------------------------------|---------------|--|
| <b>S1</b>               | SiGel            | SV D40-Si60          | 90 g                               | 15 - 40 µm    | Götec-Labortechnik GmbH,<br>Darmstadt (DE) |
| <b>S2</b>               | C18-SiGel        | Reveleris®<br>C18-WP | 4 g                                | 20 µm         | Grace,<br>Columbia (US)                    |
| Spezifizierung/Qualität |                  |                      | Hersteller                         |               |  |
| <b>Kieselgel</b>        |                  | Geduran® Si 60       | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE) |               |  |

Für die Vorfraktionierung der Proben mittels Flash-Chromatographie fanden die drei in **Tabelle 10** aufgeführten Methoden Verwendung.

**Tabelle 10** Übersicht über die Gradienten (**Flash\_1** bis **Flash\_3**) für die Flash sowie die verwendeten Lösungsmittel

|                | Fraktion | Säule | FM                  | Gradient   |           | Fluss<br>[mL/Min] | V/Reagenzglas<br>[mL] |
|----------------|----------|-------|---------------------|------------|-----------|-------------------|-----------------------|
|                |          |       |                     | Zeit [Min] | [%]       |                   |                       |
| <b>Flash_1</b> | PE.1     | S1    | A: <i>n</i> -Hexan  | 0-60       | 0 → 100 B | 30                | 20                    |
|                |          |       | B: EtOAc            | 60-90      | 100 B     |                   |                       |
|                |          |       | C: MeOH             | 90-110     | 100 C     |                   |                       |
| <b>Flash_2</b> | PE.2     | S1    | A: EtOAc            | 0-60       | 100 → 0 B | 30                | 20                    |
|                |          |       | B: <i>n</i> -Hexan  | 60-75      | 100 C     |                   |                       |
|                |          |       | C: MeOH             |            |           |                   |                       |
| <b>Flash_3</b> | PE.2.3.2 | S2    | A: H <sub>2</sub> O | 0-2        | 40 B      | 5                 | 5                     |
|                |          |       | B: MeCN             | 2-92       | 40 → 70 B |                   |                       |
|                |          |       |                     | 92-93      | 70 → 98 B |                   |                       |
|                |          |       | Flash 1             | 93-103     | 98 B      |                   |                       |
|                |          |       | Flash 2-4           | 93-120     | 98B       |                   |                       |

Fortsetzung Tabelle 10

|                       | Spezifizierung/Qualität | Hersteller   |
|-----------------------|-------------------------|--|
| <b>Acetonitril</b>    | p.a. (EMSURE®)          | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE)                             |
| <b>Ethylacetat</b>    | p.a.                    | Acros Organics, über Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b><i>n</i>-Hexan</b> | p.a.                    | Acros Organics, über Thermo Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b>Methanol</b>       | p.a. (EMSURE®)          | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                        |

#### 2.1.3.4 Zentrifugal-Verteilungschromatographie (CPC)

Bei der Zentrifugal-Verteilungschromatographie (engl. Centrifugal Partition Chromatography, CPC) sind im Gegensatz zu den vorhergehenden Verfahren sowohl mobile als auch stationäre Phase flüssig. Jede Phase kann wiederum aus mehreren Komponenten bestehen. Die CPC-Anlage (**Tabelle 11**) kann sowohl im sogenannten aufsteigenden (ascending), als auch im absteigenden (descending) Modus betrieben werden. Im aufsteigenden Modus wird die obere (leichtere) Phase als mobile Phase genutzt, die untere (schwerere) Phase ist dementsprechend die stationäre Phase. Gegensätzlich verhält es sich im absteigenden Modus. Welcher Modus Verwendung findet, hängt zum einen von der Verteilung der Probe in den Phasen, zum anderen von der Flüchtigkeit der Lösungsmittel ab.

Die beiden nicht miteinander mischbaren Phasen wurden vor Verwendung gegeneinander gesättigt (kräftiges Schütteln im Scheidetrichter, stehen lassen bis zur Phasentrennung und erneutes Aufschütteln; fünfmalige Wiederholung). Der Rotor der CPC wurde zunächst komplett mit stationärer Phase befüllt und anschließend mit mobiler Phase bei laufendem Rotor ausreichend lange äquilibriert (in der Regel bis keine stationäre Phase mehr aus dem System gespült wurde). Die Probe wurde in einem möglichst kleinem Volumen Ober- und Unterphase (zu gleichen Teilen) gelöst.



**Tabelle 11** CPC-Gerät zur Fraktionierung

|            | Modell   | Hersteller                       |
|------------|--|----------------------------------|
| <b>CPC</b> | SPOT centrifugal partition chromatography mit 250 mL Rotor | Armen Instrument, Saint-Ave (FR) |
|            | 515 HPLC-Pump (Pumpe)                                      | Waters GmbH, Eschborn (DE)       |
|            | 2111 Multirac (Fraktionskollektor)                         | LKB Bromma, Stockholm (SE)       |

**Tabelle 12** gibt eine Übersicht über die verwendeten Methoden mit den gewählten Parametern an der CPC.

**Tabelle 12** Übersicht über die Systeme (**CPC\_1** bis **CPC\_4**) für die CPC sowie die verwendeten Lösungsmittel

|              | Fraktion | Fließmittelsystem  | U/Min | Fluss [mL/Min] | V/Reagenzglas [mL] |
|--------------|----------|--|-------|----------------|--------------------|
| <b>CPC_1</b> | PE.1.3   | <i>n</i> -Hexan:MeOH:H <sub>2</sub> O<br>2:1,75:0,25 (V:V:V)     | 800   | 5              | 5                  |
| <b>CPC_2</b> | PE.1.4   | <i>n</i> -Hexan:EtOAc:MeOH:H <sub>2</sub> O<br>4:3:4:1 (V:V:V:V) | 800   | 5              | 5                  |
| <b>CPC_3</b> | PE.2.2   | <i>n</i> -Heptan:MeCN:MeOH<br>3:1:1 (V:V:V)                      | 800   | 5              | 2                  |
| <b>CPC_4</b> | PE.2.3   | <i>n</i> -Hexan:MeCN:MeOH<br>2:2:1 (V:V:V)                       | 800   | 5              | 2                  |

Fortsetzung Tabelle 12

|                        | Spezifizierung/Qualität  | Hersteller  |
|------------------------|--------------------------|---|
| <b>Acetonitril</b>     | p.a. (EMSURE®)           | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE)                                |
| <b>Ethylacetat</b>     | p.a.                     | Acros Organics, über Thermo<br>Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b><i>n</i>-Heptan</b> | HPLC-grade (Lichrosolv®) | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE)                                |
| <b><i>n</i>-Hexan</b>  | p.a.                     | Acros Organics, über Thermo<br>Fisher Scientific,<br>Waltham (US) |
| <b>Methanol</b>        | p.a. (EMSURE®)           | Merck Chemicals GmbH,<br>Darmstadt (DE)                           |

### 2.1.3.5 Analytische HPLC

Die analytische HPLC (**Tabelle 13**) wurde zur Entwicklung der Gradienten für die Endaufreinigung der Fraktionen an der semi-präparativen HPLC und zur Reinheitsbestimmung der isolierten Substanzen genutzt. Hierfür wurden die Fraktionen bzw. die Substanzen in der Konzentration 1 mg/mL in Acetonitril gelöst, durch einen Spritzenvorsatzfilter in ein HPLC-Vial filtriert und davon in der Regel 5 µL je Lauf injiziert. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung im Ultraschallbad entgast. Das Fließmittel A (Wasser) wurde jeden Tag ausgetauscht, um mikrobiellen Befall vorzubeugen.

Für die Methodenentwicklung wurde zunächst Methode HPLC\_1<sub>analyt</sub> (**Tabelle 14**) verwendet und ausgehend von diesem Ergebnis der Gradient jeder Fraktion anschließend so variiert, dass alle Peaks annähernd basisliniengetrennt vorlagen.

Bei der Reinheitsbestimmung wurde auf Methode HPLC\_2<sub>analyt</sub> (**Tabelle 14**) zurückgegriffen. Als Blindprobe (Blank) wurde zusätzlich das reine Lösungsmittel (Acetonitril) vermessen. Das Chromatogramm der jeweiligen Substanz wurde mithilfe der HPLC-Software als Max-Plot-Chromatogramm dargestellt. Das heißt, dass zu jeder Retentionszeit die maximale Absorption des vermessenen Wellenbereichs (190 - 400 nm) gezeigt wird. Von diesem Chromatogramm wurde das Max-Plot-Chromatogramm des Lösungsmittels abgezogen (Blankkorrektur) und die Reinheit nach dem Verfahren der Normalisierung bestimmt und in Prozent angegeben.

## ISOLIERUNG

Die entsprechenden Läufe sind im Anhang (**Kapitel 8, Tabelle 71**, S. 290ff.) zu finden.

**Tabelle 13** Analytische HPLC-Anlagen und zugehörige Materialien

|  | Modell  | Hersteller                                |
|--|---|---|
| <b>HPLC I</b> (analytisch)             | Elite LaChrom   | Hitachi,<br>Tokio (JP)                    |
|  | Elite LaChrom L-2200 (Autosampler)  |   |
|  | Elite LaChrom L-2130 (Pumpe)  |   |
|  | Elite LaChrom L-2350 (Säulenofen)   |   |
|  | Elite LaChrom L-2444 (DAD)  |   |
|  | EZChrom Elite 3.1.7 (Software)  |   |
| <b>HPLC II</b> (analytisch)            | Waters  | Waters GmbH,<br>Eschborn (DE)             |
|  | Waters 2707 (Autosampler)   |   |
|  | Waters 1525 (binäre Pumpe)  |   |
|  | Waters 2998 (DAD)   |   |
|  | Empower 3 (Software)  |   |
| <b>RP-18 HPLC Säule</b>                | Eclipse Plus C18<br>Partikelgröße: 3,5 µm<br>4,6 x 100 mm                     | Agilent Technologies,<br>Santa Clara (US) |
| <b>HPLC-Vial</b>                       | 11 mm CrimpSnap-Vial,<br>braun, 2 mL  | Wicom,<br>Heppenheim (DE)                 |
| <b>HPLC-Vial Ver-<br/>schlusskappe</b> | PP Schnappklappe, blau, für 11 mm<br>SnapCrimp-Vial mit Teflon/Silikon-Septum |   |
| <b>HPLC-Vial Insert</b>                | Micro Insert, 300 µL, l = 30 mm, Ø = 6 mm                                     |   |
| <b>Spritzenvorsatzfilter</b>           | Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)   |   |

**Tabelle 14** Übersicht über die Gradienten (**HPLC\_1<sub>analyt</sub>** bis **HPLC\_3<sub>analyt</sub>**) für die analytische HPLC sowie das verwendete Lösungsmittel

|                                | FM <sub>analyt</sub> | Gradient   |           | Fluss    |
|--------------------------------|----------------------|------------|-----------|----------|
|                                |                      | Zeit [Min] | [%]       | [mL/Min] |
| <b>HPLC_1<sub>analyt</sub></b> | A: H <sub>2</sub> O  | 0 - 2      | 50 B      | 0,8      |
|                                | B: MeCN              | 2 - 22     | 50 → 98 B |          |
|                                |                      | 22 - 26    | 98 B      |          |
|                                |                      | 26 - 27    | 98 → 50 B |          |
|                                |                      | 27 - 30    | 50 B      |          |
|                                |                      |            |           |          |

Fortsetzung Tabelle 14

|                           |                          |         |                                    |     |
|---------------------------|--------------------------|---------|------------------------------------|-----|
| HPLC_2 <sub>analyt</sub>  | A: H <sub>2</sub> O      | 0 - 2   | 70 B                               | 0,8 |
|                           | B: MeCN                  | 2 - 22  | 70 → 98 B                          |     |
|                           |                          | 22 - 26 | 98 B                               |     |
|                           |                          | 26 - 27 | 98 → 70 B                          |     |
|                           |                          | 27 - 30 | 70 B                               |     |
| HPLC_3 <sub>analyt.</sub> | A: H <sub>2</sub> O      | 0 - 2   | 75 B                               | 0,8 |
|                           | B:MeCN                   | 2 - 3   | 75 → 82 B                          |     |
|                           |                          | 3 - 20  | 82 B                               |     |
|                           |                          | 20 - 21 | 82 → 98 B                          |     |
|                           |                          | 21 - 24 | 98 B                               |     |
|                           |                          | 24 - 25 | 98 → 75 B                          |     |
|                           |                          | 25 - 30 | 75 B                               |     |
| Spezifizierung/Qualität   |                          |         | Hersteller                         |     |
| Acetonitril               | HPLC-grade (Lichrosolv®) |         | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE) |     |

### 2.1.3.6 Semi-präparative HPLC

Der endgültige Aufreinigungsschritt zur Isolierung der Einzelsubstanzen wurde an einer semi-präparativen HPLC durchgeführt. Zum Einsatz kamen zwei unterschiedliche Anlagen (**Tabelle 15**). Die Fraktionen wurden in der Konzentration 10 mg/mL in den Startbedingungen des jeweiligen Gradienten gelöst. Die Fließmittel wurden vor der Verwendung im Ultraschallbad entgast und das Fließmittel A (Wasser) wurde jeden Tag erneuert. Nach ausreichend langer Äquilibration des Systems mit den Anfangsbedingungen des Gradienten wurden zunächst etwa 50 µL injiziert, um die Übertragbarkeit der Methode von der analytischen auf die semi-präparative HPLC zu überprüfen. Nach Anpassen des Gradienten wurden je Lauf in der Regel 250 µL aufgegeben. Verwendung fanden die in **Tabelle 16** aufgeführten Gradienten.

## ISOLIERUNG

**Tabelle 15** Semi-präparative HPLC-Anlagen und zugehörige Materialien

|   | Modell   | Hersteller                                 |
|---|--|--|
| <b>HPLC I</b> (semi-präparativ)                         | ProStar HPLC   | Varian Deutschland GmbH,<br>Darmstadt (DE) |
|   | ProStar 210 (Pumpen)   |  |
|   | ProStar 335 (DAD)  |  |
|   | Galaxie 1.9.302.952 (Software)                                 |  |
| <b>HPLC II</b> (semi-präparativ)                        | 1260 Infinity HPLC   | Agilent Technologies,<br>Santa Clara (US)  |
|   | G1328C (Probeninjektor)  |  |
|   | Probenschleife 2 mL  |  |
|   | G1361A (Pumpen)  |  |
|   | G1315D (DAD)   |  |
|   | G1364B (Fraktionskollektor)                                    |  |
|   | OpenLab CDS (Software)   |  |
| <b>RP-18 HPLC-Säule</b>                                 | Dynamax Pursuit XRs, C18<br>Partikelgröße: 5 µm<br>10 x 250 mm | Varian,<br>Darmstadt (DE)                  |
| <b>Probendosierspritze</b><br>(zur manuellen Injektion) | 5 mL   | Hamilton Bonaduz AG,<br>Bonaduz (CH)       |

**Tabelle 16** Übersicht über die Gradienten (**HPLC\_1** bis **HPLC\_9**) für die semi-präparative HPLC sowie das verwendete Lösungsmittel

|               | Fraktion | FM                  | Gradient   |            | Fluss    |
|---------------|----------|---------------------|------------|------------|----------|
|               |          |                     | Zeit [Min] | [%]        | [mL/Min] |
| <b>HPLC_1</b> | PE.1.3.2 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5      | 85 B       | 3        |
|               | PE.1.3.3 | B: MeCN             | 5 - 7      | 85 → 90 B  |          |
|               |          |                     | 7 - 25     | 90 B       |          |
|               |          |                     | 25 - 27    | 90 → 100 B |          |
|               |          |                     | 27 - 30    | 100 B      |          |
|               |          |                     | 30 - 32    | 100 → 85 B |          |
|               |          |                     | 32 - 35    | 85 B       |          |
|               |          |                     |            |            |          |

Fortsetzung Tabelle 16

|               |          |                     |         |            |   |
|---------------|----------|---------------------|---------|------------|---|
| <b>HPLC_2</b> | PE.1.3.4 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5   | 80 B       | 3 |
|               |          | B: MeCN             | 5 - 7   | 80 → 85 B  |   |
|               |          |                     | 7 - 12  | 85 B       |   |
|               |          |                     | 12 - 14 | 85 → 95 B  |   |
|               |          |                     | 14 - 22 | 95 B       |   |
|               |          |                     | 22 - 24 | 95 → 100 B |   |
|               |          |                     | 24 - 27 | 100 B      |   |
|               |          |                     | 27 - 29 | 100 → 80 B |   |
|               |          |                     | 29 - 32 | 80 B       |   |
|               |          |                     |         |            |   |
| <b>HPLC_3</b> | PE.1.3.6 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5   | 80 B       | 3 |
|               |          | B: MeCN             | 5 - 7   | 80 → 85 B  |   |
|               |          |                     | 7 - 25  | 85 B       |   |
|               |          |                     | 25 - 27 | 85 → 100 B |   |
|               |          |                     | 27 - 32 | 100 B      |   |
|               |          |                     | 32 - 34 | 100 → 80 B |   |
|               |          |                     | 34 - 38 | 80 B       |   |
|               |          |                     |         |            |   |
| <b>HPLC_4</b> | PE.1.4.3 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5   | 75 B       | 3 |
|               |          | B: MeCN             | 5 - 7   | 75 → 80 B  |   |
|               |          |                     | 7 - 20  | 80 B       |   |
|               |          |                     | 20 - 22 | 80 → 100 B |   |
|               |          |                     | 22 - 25 | 100 B      |   |
|               |          |                     | 25 - 27 | 100 → 75 B |   |
|               |          |                     | 27 - 30 | 75 B       |   |
|               |          |                     |         |            |   |
| <b>HPLC_5</b> | PE.2.2.2 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5   | 95 B       | 3 |
|               |          | B: MeCN             | 5 - 7   | 95 → 98 B  |   |
|               |          |                     | 7 - 32  | 98 B       |   |
|               |          |                     | 32 - 34 | 98 → 100 B |   |
|               |          |                     | 34 - 38 | 100 B      |   |
|               |          |                     | 38 - 40 | 100 → 95 B |   |
|               |          |                     | 40 - 48 | 95 B       |   |
|               |          |                     |         |            |   |
| <b>HPLC_6</b> | PE.2.2.4 | A: H <sub>2</sub> O | 0 - 5   | 80 B       | 3 |
|               |          | B: MeCN             | 5 - 7   | 80 → 85 B  |   |
|               |          |                     | 7 - 38  | 85 B       |   |
|               |          |                     | 38 - 40 | 85 → 100 B |   |
|               |          |                     | 40 - 45 | 100 B      |   |
|               |          |                     | 45 - 47 | 100 → 80 B |   |
|               |          |                     | 47 - 50 | 80 B       |   |
|               |          |                     |         |            |   |

## ISOLIERUNG

Fortsetzung Tabelle 16

|                         |            |                          |            |                                    |   |
|-------------------------|------------|--------------------------|------------|------------------------------------|---|
| HPLC_7                  | PE.2.3.2.2 | A: H <sub>2</sub> O      | 0 - 5      | 55 B                               | 3 |
|                         |            | B: MeCN                  | 5 - 7      | 55 → 70 B                          |   |
|                         |            |                          | 7 - 32     | 70 B                               |   |
|                         |            |                          | 32 - 34    | 70 → 98 B                          |   |
|                         |            |                          | 34 - 40    | 98 B                               |   |
|                         |            |                          | 40 - 42    | 98 → 55 B                          |   |
|                         |            |                          | 42 - 50    | 55 B                               |   |
|                         |            |                          |            |                                    |   |
| HPLC_8                  | PE.2.3.2.5 | A: H <sub>2</sub> O      | 0 - 5      | 75 B                               | 3 |
|                         |            | B: MeCN                  | 5 - 7      | 75 → 84 B                          |   |
|                         |            |                          | 7 - 32     | 84 B                               |   |
|                         |            |                          | 32 - 34    | 84 → 100 B                         |   |
|                         |            |                          | 34 - 40    | 100 B                              |   |
|                         |            |                          | 40-42      | 100 → 75 B                         |   |
|                         |            |                          | 42-50      | 75 B                               |   |
|                         |            |                          |            |                                    |   |
| HPLC_9                  | PE.2.3.2.6 | A: H <sub>2</sub> O      | 0 - 5      | 80 B                               | 3 |
|                         |            | B: MeCN                  | 5 - 7      | 80 → 86 B                          |   |
|                         |            |                          | 7 - 32     | 86 B                               |   |
|                         |            |                          | 32 - 34    | 86 → 100 B                         |   |
|                         |            |                          | 34 - 43    | 100 B                              |   |
|                         |            |                          | 43 - 45    | 100 → 80 B                         |   |
|                         |            |                          | 45 - 50    | 80 B                               |   |
|                         |            |                          |            |                                    |   |
| Spezifizierung/Qualität |            |                          | Hersteller |                                    |   |
| Acetonitril             |            | HPLC-grade (Lichrosolv®) |            | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE) |   |

Die Detektion der Peaks erfolgte mit einem DAD bei 195 bzw. 205 nm und das Sammeln wurde manuell durchgeführt. Nach dem Trocknen und Auswiegen der Substanzen, wurde ein Übersichts-DC gemäß **Kapitel 2.1.3.1.1**, S. 24 und ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum gemäß **Kapitel 2.1.3.1.2**, S. 26 zur Überprüfungen des Isoliererfolges angefertigt. Anschließend konnten weitestgehend reine Substanzen an die Abteilungen NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie der Zentralen Analytik, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg für weiterführende Experimente übergeben werden.

## 2.1.4 Strukturaufklärung und Charakterisierung

### 2.1.4.1 NMR-Spektroskopie

Die Durchführung verschiedener NMR-spektroskopischer Experimente diente zur Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen. Hierfür wurden die Substanzen in etwa 0,6 mL deuteriertem Chloroform gelöst, in NMR-Röhrchen überführt und in der Abteilung NMR-Spektroskopie der Zentralen Analytik (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) vermessen.

Anwendung fanden sowohl eindimensionale ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) als auch zweidimensionale Verfahren ( $[\text{}^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ -HSQC **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence,  $[\text{}^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}]$ -HMBC **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation,  $[\text{}^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}]$ -COSY **C**orrelation **S**pectroscop**Y** und  $[\text{}^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}]$ -NOESY **N**uclear **O**verhauser **E**nhancement **S**pectroscop**Y**). Aufgenommen wurden die Spektren bei Raumtemperatur (295 K) an einem AVANCE III 600 NMR bei einer Resonanzfrequenz von 600,25 MHz für die  $^1\text{H}$ -Protonen und 150,95 MHz für die  $^{13}\text{C}$ -Atome, auf das Signal des nicht-deuterierten  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,27 ppm, s) im Lösungsmittel bzw. des deuterierten  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}}$  77,0 ppm) bezogen und mit Topspin® ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen ( $\delta_{\text{H}}$  und  $\delta_{\text{C}}$ ) wurden jeweils in ppm angegeben, die dazugehörigen Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz.

#### *Vorgehensweise*

Anhand des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums wurden zunächst die Anzahl und die Lage der Kohlenstoffatome ermittelt. Diesen konnte anschließend mithilfe des HSQC-Spektrums direkt gebundene Protonen zugeordnet werden, welche als grüne bzw. blaue Kreuzsignale visualisiert werden. Ein grünes Signal spricht hierbei für eine Methylengruppe, wohingegen ein blauer Spot für eine Methin- oder Methylgruppe steht.

Im  $^1\text{H}$ -Spektrum konnte durch Integration der einzelnen Signale die genaue Anzahl der Wasserstoffatome bestimmt werden und so alle Kohlenstoffatome als quartär, tertiär, sekundär oder primär charakterisiert werden. Außerdem konnte im eindimensionalen Protonenspektrum anhand der Multiplizität der Signale auf die Anzahl der vicinalen Protonen geschlossen (sogenannte „ $n + 1$ “-Regel, wobei „ $n$ “ der Protonenanzahl entspricht) und die Kopplungskonstanten ermittelt werden.

Das HMBC-Experiment diente zur Verknüpfung der einzelnen Molekülbausteine, indem heteronuklearer Kopplungen über mehrere Bindungen ( $^2J$ ,  $^3J$ ,  $^4J$ -Korrelationen) identifiziert werden konnten.



Zur Bestimmung der relativen Stereochemie zahlreicher Chiralitätszentren wurden vor allem die NOESY-Daten genutzt. Bei dieser NMR-Technik können homonukleare Kopplungen über den Raum bis zu einem Abstand von 5 Å detektiert werden. Hilfreich bei der Aufklärung der räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen im Molekül waren auch Multiplizitäten und die damit verbundenen Kopplungskonstanten der Protonensignale im  $^1\text{H}$ -Spektrum. Es besteht ein Zusammenhang zwischen den Kopplungskonstanten und dem Torsionswinkel  $\phi$  vicinaler Protonen, der durch die Karplus-Kurve veranschaulicht wird.

**Tabelle 17** NMR-Spektrometer mit Zubehör

|                               | Modell   | Hersteller                         |
|-------------------------------|--|------------------------------------|
| <b>NMR-Spektrometer</b>       | AVANCE III 600 NMR mit Bruker 5 mm TCI CryoProbe | Bruker Corporation, Billerica (US) |
| <b>NMR-Röhrchen</b>           | 507-HP-8   | Norell, Landsville (US)            |
| <b>NMR-Software</b>           | Topspin® 3.2                                     | Bruker Corporation, Billerica (US) |
|                               | Spezifizierung/Qualität                          | Hersteller                         |
| <b>Chloroform, deuteriert</b> | Chloroform $\text{d}_1$ 99,8 %                   | Deutero, Kastellaun (DE)           |

#### 2.1.4.2 Massenspektrometrie

Zur Ermittlung der Summenformeln der isolierten Verbindungen wurde eine geringe Probenmenge an die Abteilung Massenspektrometrie der Zentralen Analytik (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg) übergeben und dort vermessen. Durch Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus und einem Quadrupol-Time of Flight Massenspektrometer wurden ESI-HRMS-Spektren aufgenommen und die daraus ersichtlichen Pseudo-Molekülionen z. B.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  dienten zur Errechnung der Summenformeln.

Tabelle 18 Massenspektrometer

|                    | Modell   | Hersteller                                |
|--------------------|--|---|
| Massenspektrometer | Agilent MS Q-TOF 6540 UHD<br>AJS ESI G6540A<br>(Ionenquelle) | Agilent Technologies,<br>Santa Clara (US) |

### 2.1.4.3 UV-Vis-Spektroskopie

Absorptionsmaxima und die daraus resultierenden molaren Absorptionskoeffizienten wurden nur für die Substanzen **1**, **2**, **3**, **26** und **27** mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt, da die restlichen Substanzen kein ausreichend großes Chromophor aufweisen. Hierfür wurden die isolierten Verbindungen in Methanol für Spektroskopie in der Konzentration 0,04 mg/mL (**1**, **2** und **3**) bzw. 0,06 mg/mL (**26** und **27**) gelöst, in eine Quarzküvette mit der Schichtdicke 1 cm überführt und gegen reines Methanol als Kompensationsflüssigkeit vermessen. Bei der Messung wurde der gesamte UV-Vis-Bereich von 200 - 800 nm abgefahren. Die Absorption sollte im linearen Bereich zwischen 0,25 - 0,75 liegen. Lag sie zu hoch, wurde die Probe im nötigen Verhältnis mit Methanol für Spektroskopie verdünnt und so die Konzentration angepasst. Aus der gemessenen Absorption in den Maxima kann durch Umformung des Lambert-Beerschen Gesetzes der molare Absorptionskoeffizient errechnet werden.

Formel 1 Lambert-Beersches Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Umformung:

Formel 2 Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d}$$

- $\varepsilon$**  molarer Absorptionskoeffizient [L/(mol · cm)]  
**A** Absorption  
**c** Konzentration [mol/L]  
**d** Schichtdicke der Messküvette [cm]

**Tabelle 19** UV-Spektrometer und Zubehör

|                             | Modell                             | Hersteller                         |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>UV-Spektrophotometer</b> | Cary 50 Scan                       | Varian,<br>Darmstadt (DE)          |
|                             | Cary WinUV 3.00(182)<br>(Software) |                                    |
| <b>Quarzküvette</b>         | QS: 10,00 mm                       | Hellma,<br>Müllheim (DE)           |
|                             | Spezifizierung/Qualität            | Hersteller                         |
| <b>Methanol</b>             | für Spektroskopie (Uvasol®)        | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE) |

#### 2.1.4.4 Polarimetrie

Um die optische Aktivität der isolierten Verbindungen zu bestimmen, wurde der spezifische Drehwinkel  $[\alpha]_D^T$  ermittelt. Hierfür wurden die erhaltenen Mengen an Isolat in 0,8 mL Methanol für Spektroskopie gelöst und in ein Messrohr der Länge 5 cm gefüllt. Die Messung des Drehwinkels von linear polarisiertem Licht der Wellenlänge 589 nm erfolgte bei Temperaturen zwischen 24 °C und 27 °C. Der angegebene Wert  $[\alpha]_D^T$  ist der Mittelwert aus zehn Einzelmessungen.

**Formel 3** Berechnung des Drehwertes

$$[\alpha]_D^T = \frac{\alpha}{c \cdot d}$$

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>[<math>\alpha</math>]</b> | spezifischer Drehwert $[(^\circ \cdot \text{mL})/(\text{g} \cdot \text{dm})]$ |
| <b>T</b>                     | Temperatur $[\text{°C}]$  |
| <b>D</b>                     | D-Linie des Natriumlichtes (589,30 nm)  |
| <b><math>\alpha</math></b>   | Drehwinkel $[\text{°}]$   |
| <b>c</b>                     | Konzentration $[\text{g/mL}]$   |
| <b>l</b>                     | Schichtdicke $[\text{dm}]$  |

**Tabelle 20** Polarimeter

|                    | Modell                      | Hersteller                                   |
|--------------------|-----------------------------|--|
| <b>Polarimeter</b> | UniPol L 1000               | Schmidt + Haensch GmbH & Co.,<br>Berlin (DE) |
|                    | Spezifizierung/Qualität     | Hersteller                                   |
| <b>Methanol</b>    | für Spektroskopie (Uvasol®) | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE)           |

#### 2.1.4.5 Circular dichroismus

Für die Messung des Circular dichroismus wurden die isolierten Verbindungen mit Methanol für Spektroskopie in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  gelöst, in eine 1 mm Quarzküvette überführt und am Spektropolarimeter gegen reines Lösungsmittel vermessen. Die entsprechenden Geräteeinstellungen sind **Tabelle 21** zu entnehmen. Für das endgültige Spektrum wurden die Ergebnisse aus zehn Messzyklen gemittelt, die Elliptizität in die molare Elliptizität umgewandelt und abschließend die Kurve über den Savitzky-Golay Algorithmus mit einer Konvolutionsbreite von 15 geglättet.

**Tabelle 21** Gewählte Geräteeinstellungen des Spektropolarimeters

| Parameter           | Einstellung    |
|---------------------|----------------|
| Sensitivität        | Standard       |
| Start-Wellenlänge   | 400 nm         |
| End-Wellenlänge     | 190 nm         |
| Messschritte        | 0,5 nm         |
| Scanmodus           | kontinuierlich |
| Scangeschwindigkeit | 100 nm/Min     |
| Ansprechzeit        | 0,5 Sek        |
| Bandbreite          | 1 nm           |
| Wiederholungen      | 10             |
| Temperatur          | 22 °C          |

## ISOLIERUNG

Für die graphische Darstellung der CD-Spektren wurde die molare Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die molare Elliptizität berechnet sich nach folgender Formel:

**Formel 4** Berechnung der molaren Elliptizität

$$[\theta]_M = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot l}$$

**$[\theta]_M$**  molare Elliptizität  $[(^\circ \cdot \text{cm}^2)/\text{dmol}]$

**$\theta$**  Elliptizität  $[^\circ]$

**$M$**  molare Masse  $[\text{g/mol}]$

**$c$**  Konzentration  $[\text{g/mL}]$

**$l$**  Schichtdicke  $[\text{cm}]$

**Tabelle 22** CD-Spektropolarimeter

|                              | Modell                      | Hersteller                                   |
|------------------------------|-----------------------------|--|
| <b>CD-Spektropolarimeter</b> | J-710                       | Jasco Deutschland GmbH,<br>Groß-Umstadt (DE) |
|                              | Spezifizierung/Qualität     | Hersteller                                   |
| <b>Methanol</b>              | für Spektroskopie (Uvasol®) | Merck Chemicals,<br>Darmstadt (DE)           |

Die CD-Spektren aller isolierten Verbindungen sind im Anhang (**Kapitel 8, Tabelle 72**, S. 293f.) abgebildet.

## 2.2 Isolierungsschema

### 2.2.1 Isolierungsstrategie

Bei der Isolierung von Sekundärstoffen aus Pflanzenmaterial können verschiedene Strategien verfolgt werden. Die geläufigsten sind

- Die Dünnschichtchromatographie-geleitete Fraktionierung
- Die NMR-geleitete Fraktionierung
- Die Bioaktivitäts-geleitete Fraktionierung

Da jedes Prinzip sowohl Vor- als auch Nachteile aufweist, muss je nach Aufgabenstellung entschieden werden, welche Art der Fraktionierung Anwendung findet.

In der hier vorliegenden Arbeit fand eine Kombination aus DC- und NMR-geleiteter Fraktionierung statt. Obwohl es sich bei der Substanzklasse der Acylphloroglucinole um eine sehr heterogene Gruppe mit vielen Variationsmöglichkeiten handelt, treten gewisse Strukturmerkmale in fast allen Vertretern auf und können einen Hinweis für die Identifizierung der Verbindungen geben.

So sind alle isolierten Substanzen mit Isopreneinheiten substituiert, die im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum an einem charakteristischen Triplett ( $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm) für das olefinischen Proton zu erkennen sind. Des Weiteren konnte den erhaltenen Verbindungen ein aliphatischer Acylrest zugeordnet werden, der ebenfalls bereits im Protonenspektrum anhand typischer Dubletts und Triplets (im Bereich von  $\delta_{\text{H}} 0,7 - 1,2$  ppm) im Hochfeld angezeigt wird.

Entsprechend einer vorliegenden Masterarbeit (Liedlbier 2015) wurden die angefertigten Übersichts-DCs auf Banden überprüft, die bei 254 nm mehr oder weniger ausgeprägte Fluoreszenzlöschung aufweisen und bei 366 nm selbst nicht oder dunkelblau fluoreszieren. Nach Derivatisierung der Platten mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz konnten die Acylphloroglucinole entsprechend ihrem Verhalten in zwei Gruppen geteilt werden: diejenigen, welche keine Eigenfluoreszenz zeigten, färbten sich violett und besaßen bei 366 nm eine violett-rote Fluoreszenz sowie diejenigen, welche dunkelblau fluoreszierten, erschienen als orangebraune Spots mit sehr dunkler Fluoreszenz bei 366 nm. Entsprechende Bilder der Dünnschichtchromatogramme von Christina Liedlbier sind im Anhang (**Kapitel 8, Abbildung 156**, S. 295) zu finden.

Das sich aus dieser Strategie ergebende Isolierungsschema der insgesamt 30 isolierten Verbindungen, ausgehend vom PE-Extrakt der oberirdischen Teile von *H. hirsutum*, ist in **Abbildung 13** dargestellt.

## ISOLIERUNG

Hyperforin-Typ (A-Typ)  
 Adamantan-Typ  
 Homoadamantan-Typ  
 Clusianon-Typ (B1-Typ)  
 Weitere Substanzen

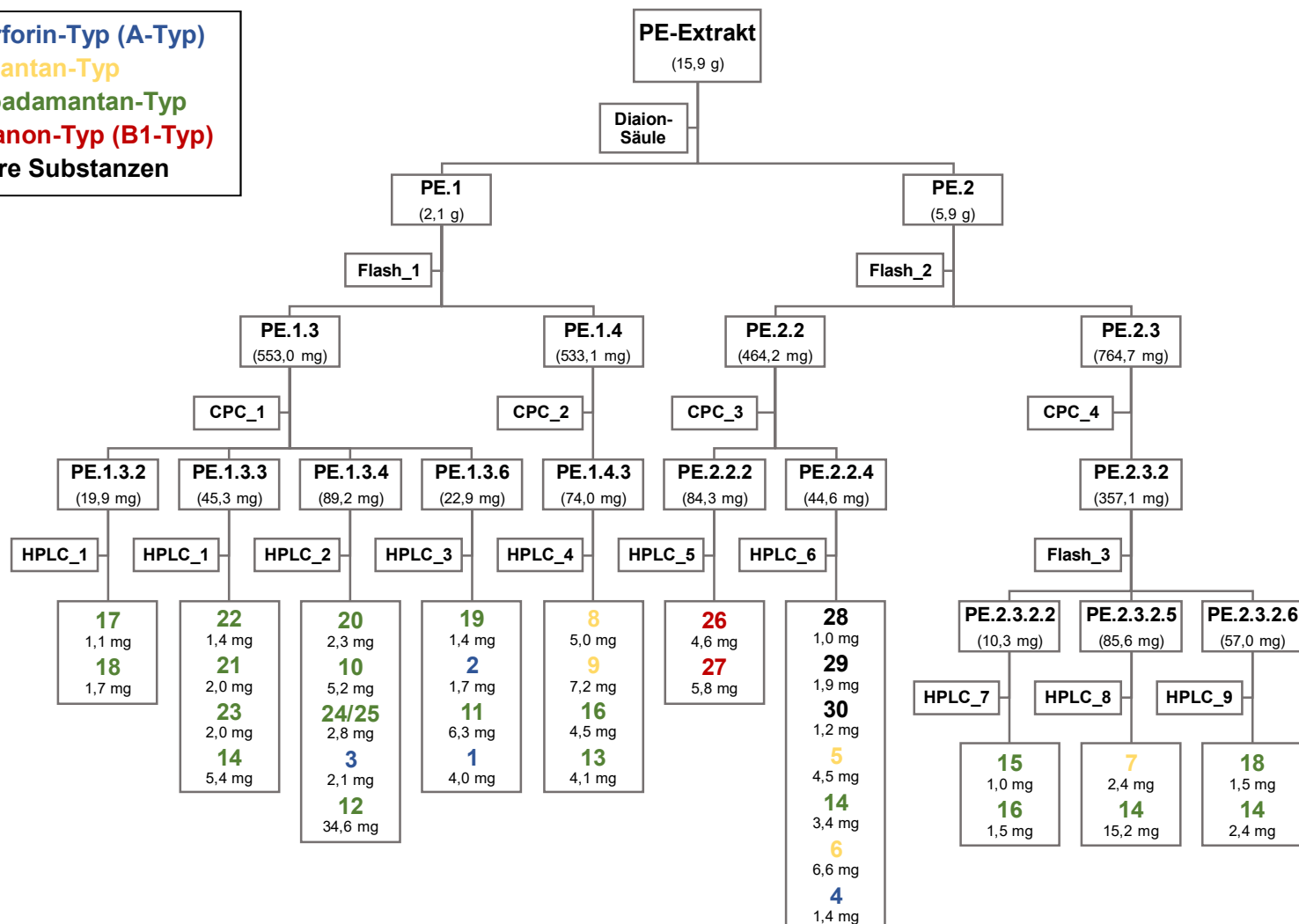
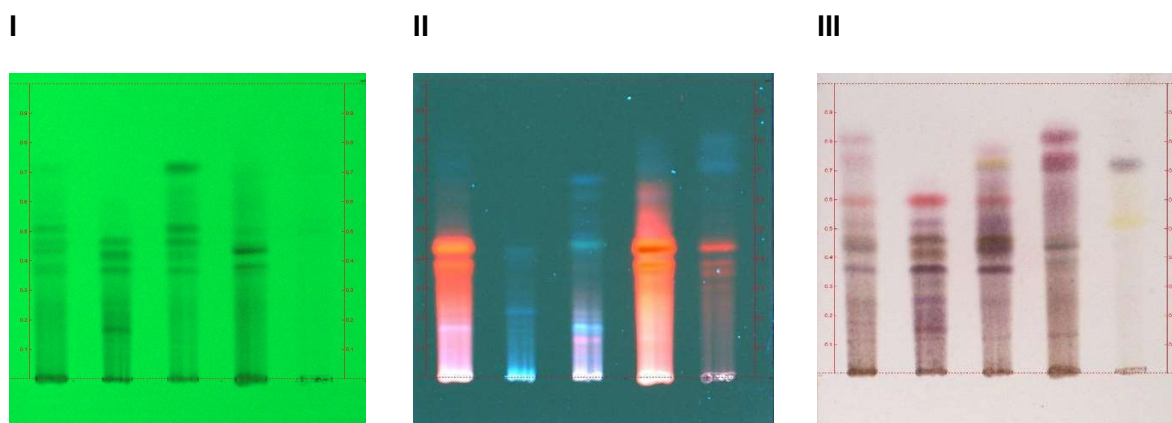


Abbildung 13 Isolierungsschema der 30 Verbindungen aus 15,9 g des PE-Extrakts der oberirdischen Teile von *H. hirsutum*

### 2.2.2 Entfettung des PE-Extraktes mittels Säulenchromatographie an Diaion® HP-20

Der Petrolether-Extrakt (15,9 g) aus *H. hirsutum* L. sollte in einem ersten Fraktionierungsschritt von lipophilen Bestandteilen wie Lipiden, Fettsäuren, Chlorophyll und Wachsen befreit werden. Hierzu wurde der Extrakt wie in **Kapitel 2.1.3.2**, S. 26 bereits beschrieben aufeinanderfolgend erschöpfend mit Methanol 90 % (V/V), Methanol 100 %, Dichlormethan und Petrolether an Diaion® HP-20 Material fraktioniert und vier Fraktionen (**PE.1** bis **PE.4**) erhalten. Die erste Fraktion (**PE.1**) wurde mit Methanol 90 % (V/V) intensiv gelb eluiert und ergab 2,1 g. Die Elution mit 100%igem Methanol führte zu 5,9 g der zweiten Fraktion (**PE.2**), ebenfalls intensiv gelb gefärbt. Das im Extrakt enthaltene Chlorophyll, bislang vom Säulenmaterial zurückgehalten, wurde erst bei der Verwendung von Dichlormethan dunkelgrün von der Säule gespült und als Fraktion **PE.3** (5,6 g) bezeichnet. Zum Abschluss wurde das Säulenmaterial mit Petrolether gesäubert und ergab 0,6 g **PE.4**.



**Abbildung 14** Übersichts-DC nach der Entfettung des PE-Extrakts mittels Diaion® HP-20

Dargestellt sind der ursprüngliche **PE-Extrakt** (Bahn 1) sowie die neu erhaltenen Fraktionen **PE.1** bis **PE.4** (Bahnen 2 bis 5) unterivatisiert bei 254 nm (I) und 366 nm (II) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei Tageslicht (III); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Anhand des Übersichts-DCs (**Abbildung 14**) wurde deutlich, dass die Abtrennung des Chlorophylls erfolgreich war. Dieses erscheint bei der Betrachtung unter 366 nm als intensiv rot fluoreszierende Banden und war in den ersten beiden Fraktionen **PE.1** und **PE.2** nicht vorhanden. Fraktion **PE.3** schien dagegen hauptsächlich aus Chlorophyllen zu bestehen.



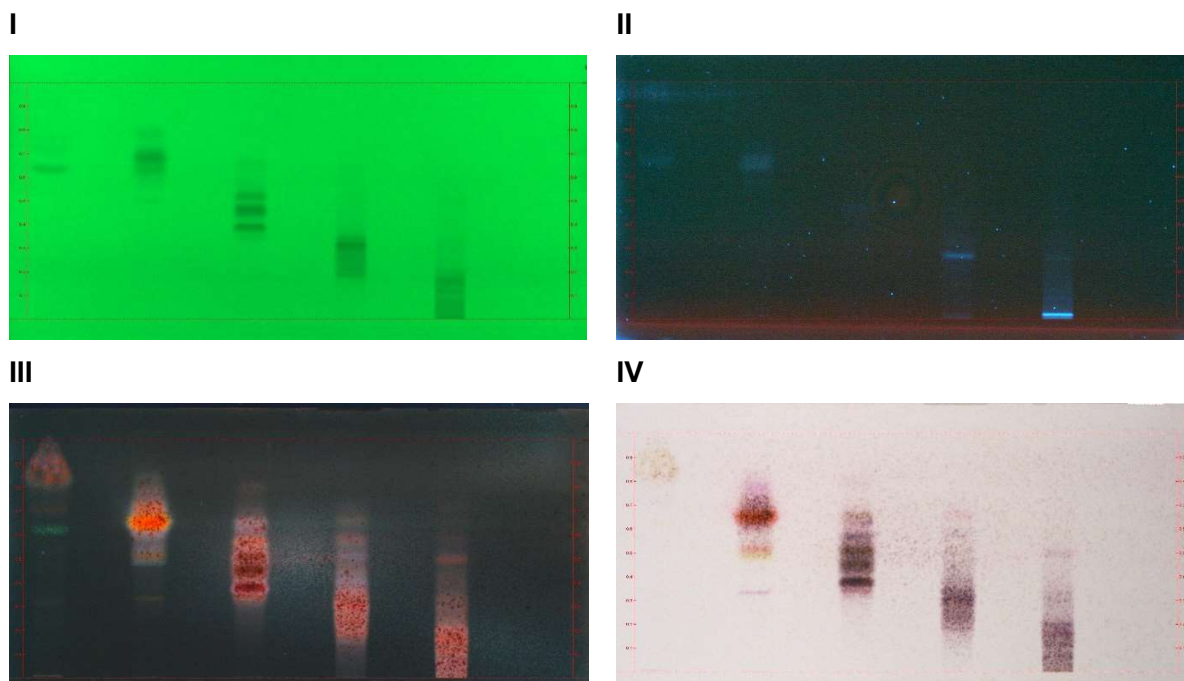
### 2.2.3 Fraktionierung von PE.1 mittels Flash-Chromatographie

Mit **PE.1** (2,1 g, Methanol 90 %) wurde eine Auftrennung per Flash-Chromatographie an Kieselgel (Flash\_1; **Tabelle 10**, S. 29) durchgeführt. Hierfür wurde die Fraktion in wenig *n*-Hexan p.a. gelöst, mit etwa 5 g Kieselgel versetzt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die gesammelten Fraktionen wurden per DC überprüft und zu sinnvollen Unterfraktionen vereinigt. Der Lauf ergab fünf neue Fraktionen (**PE.1.1** bis **PE.1.5**) und eine Spülfraktion (**PE.1.MeOH**). Auffällig war die hohe Auswaage an **PE.1.MeOH**, was dadurch zu erklären ist, dass sich in reinem Methanol das Kieselgel des Säulenbettes teilweise löst und ebenfalls eluiert wird. Nach Vereinigung der entsprechenden Reagenzgläser wurden die Fraktionen am Rotationsverdampfer eingeeengt, in tarierte Schnappdeckelgläser überführt, unter Stickstoff getrocknet und ausgewogen. Die erhaltenen Massen und die jeweiligen Elutionsbereiche sind in **Tabelle 23** aufgeführt.

**Tabelle 23** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.1.1** bis **PE.1.5** und **PE.1.MeOH**) an Kieselgel-Flash-Chromatographie

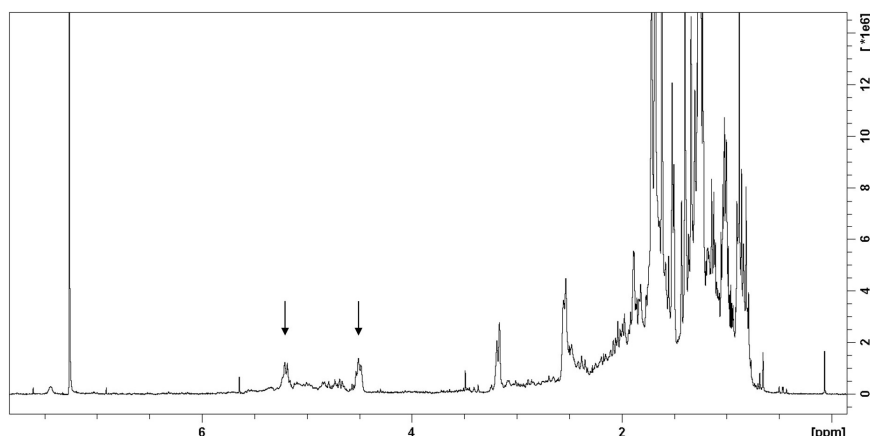
| Fraktion         | Elutionsbereich [mL] | Auswaage [mg] |
|------------------|----------------------|---------------|
|                  | Flash                | Gesamt        |
| <b>PE.1.1</b>    | 0 - 220              | <b>5,8</b>    |
| <b>PE.1.2</b>    | 220 - 340            | <b>27,7</b>   |
| <b>PE.1.3</b>    | 340 - 700            | <b>553,0</b>  |
| <b>PE.1.4</b>    | 700 - 1140           | <b>533,1</b>  |
| <b>PE.1.5</b>    | 1140 - 2780          | <b>669,1</b>  |
| <b>PE.1.MeOH</b> | 2780 - 3180          | <b>751,2</b>  |

Für ein Übersichts-DC wurden die Fraktionen in einem geeigneten Lösungsmittel entsprechend **Kapitel 2.1.3.1.1**, S. 24 gelöst.



**Abbildung 15 Übersichts-DC nach der Fraktionierung von PE.1 an Kieselgel mittels Flash-Chromatographie**  
Dargestellt sind die Fraktionen **PE.1.1** bis **PE.1.5** und **PE.1.MeOH** (Bahnen 1 bis 6) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Das Übersichts-DC (**Abbildung 15**) zeigt deutlich, dass die Substanzen in steigender Polarität eluiert wurden. Auf Bahn 3 färbten sich mehrere Banden bei  $R_F$  0,40 - 0,55 mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz bei Tageslicht intensiv lila und zeigten bei 366 nm charakteristische Fluoreszenz. Auch im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (**Abbildung 16**) ließen sich bereits charakteristische Triplets ~5 ppm erahnen, sodass Fraktion **PE.1.3** für weiterführende Fraktionierungen ausgewählt wurde.



**Abbildung 16**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.1.3** in  $\text{CDCl}_3$ ; die Pfeile deuten auf die charakteristischen Triplets bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm hin

Da weder die Chromatogramme noch die dazugehörigen  $^1\text{H}$ -Spektren der anderen Fraktionen eindeutige Anzeichen für die Anwesenheit von Acylphloroglucinolen zeigten, auf Bahn 4 jedoch überwiegend lila-gefärbte Regionen zu erkennen waren, wurde **PE.1.4** ebenfalls für weitere Fraktionierungsschritte verwendet.

#### 2.2.4 Fraktionierung von **PE.1.3** mittels CPC

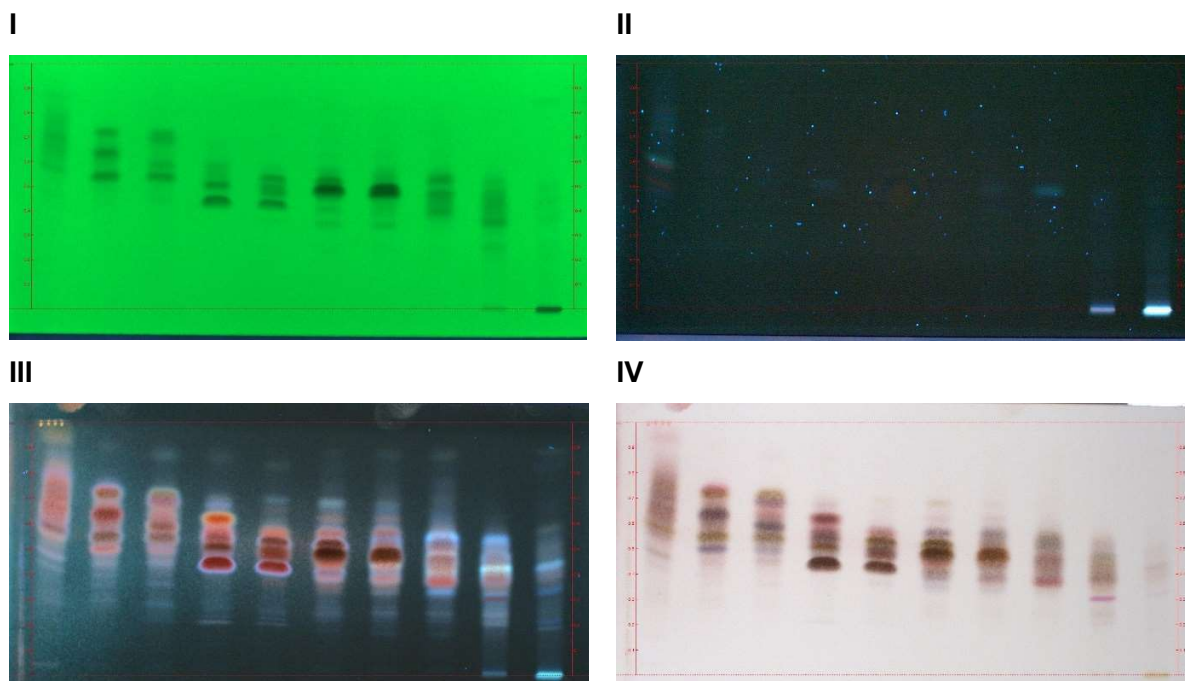
Im nächsten Fraktionierungsschritt wurde Fraktion **PE.1.3** (533 mg, 340 - 700 mL) an der CPC chromatographiert. Mit dem Wechsel des Trennprinzips von Adsorptionschromatographie an Kieselgel zu Flüssig-Flüssig-Chromatographie sollte erneut ein gutes Trennergebnis erzielt werden. In Vorversuchen wurde ein geeignetes System aus zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, welche aus mehreren Komponenten bestehen können, entwickelt. Anwendung fand für Fraktion **PE.1.3** ein System aus *n*-Hexan, Methanol und Wasser (CPC\_1; **Tabelle 12**, S. 31). Zunächst wurde die Chromatographie im aufsteigenden Modus durchgeführt, d.h. die Oberphase des Zwei-Phasen-Systems entsprach der mobilen, die Unterphase der stationären Phase. Anschließend wurden die Rollen getauscht und das System zum Schluss mit Methanol gespült.

Entsprechend der Fraktionskontrolle per DC wurden acht neue Fraktionen (ascending Modus) erhalten, die vereinigt, einrotiert, in tarierte Schnappdeckelgläsern überführt, getrocknet und gewogen wurden. Die sich hieraus ergebenden Auswaagen und der Elutionsbereich der jeweiligen Fraktion sind in **Tabelle 24** finden.

**Tabelle 24** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.1.3.1** bis **PE.1.3.8** sowie **PE.1.3.descending** und **PE.1.3.MeOH**) an der CPC

| Fraktion                 | Elutionsbereich [mL] | Auswaage [mg] |
|--------------------------|----------------------|---------------|
|                          | CPC                  | Gesamt        |
| <b>PE.1.3.1</b>          | 0 - 100              | <b>6,3</b>    |
| <b>PE.1.3.2</b>          | 100 - 150            | <b>19,9</b>   |
| <b>PE.1.3.3</b>          | 150 - 245            | <b>45,3</b>   |
| <b>PE.1.3.4</b>          | 245 - 370            | <b>89,2</b>   |
| <b>PE.1.3.5</b>          | 370 - 520            | <b>124,3</b>  |
| <b>PE.1.3.6</b>          | 520 - 600            | <b>22,9</b>   |
| <b>PE.1.3.7</b>          | 600 - 860            | <b>32,0</b>   |
| <b>PE.1.3.8</b>          | 860 - 1115           | <b>15,4</b>   |
| <b>PE.1.3.descending</b> | 0 - 230              | <b>59,2</b>   |
| <b>PE.1.3.MeOH</b>       |                      | <b>1,0</b>    |

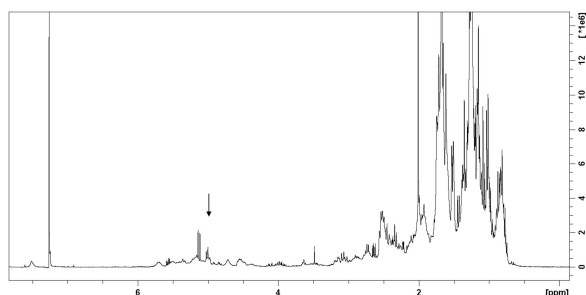
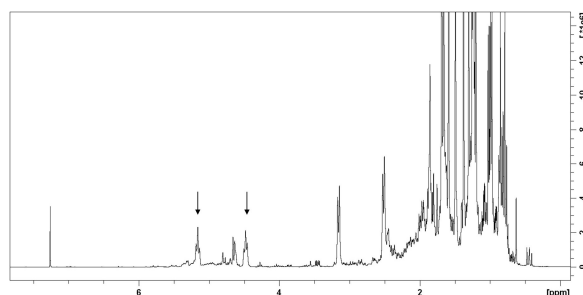
Das angefertigte Übersichts-DC (**Abbildung 17**) verdeutlichte das gute Trennergebnis der Fraktionierung mittels CPC. Interessant erschien insbesondere auf den Bahnen 4 und 5 (**PE.1.3.4** und **PE.1.3.5**) eine Bande bei  $R_F \sim 0,45$ , welche Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, keine oder eine nur sehr schwer zu erkennende Eigenfluoreszenz bei 366 nm und nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz eine dunkelbraune Färbung aufweist. Bei Betrachtung der derivatisierten Platte bei 366 nm erscheint die Bande rötlich gefärbt mit einer auffälligen hellblauen Umrandung. Ebenso vielversprechend in Bezug auf Acylphloroglucinole sind die Fraktionen **PE.1.3.6** und **PE.1.3.7**. Die darin enthaltene Bande bei  $R_F \sim 0,50$  besitzt ebenfalls neben der intensiv fluoreszenzlöschenden Eigenschaft (254 nm), eine orange-braune Färbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (Vis) und zeigt bei 366 nm dunkelbraune Fluoreszenz.



**Abbildung 17** Übersichts-DC nach der Fraktionierung von PE.1.3 mittels CPC

Dargestellt sind die Fraktionen **PE.1.3.1** bis **PE.1.3.8** (Bahnen 1 bis 8) sowie **PE.1.3.descending** und **PE.1.3.MeOH** (Bahnen 9 und 10) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Die aufgenommenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Unterfraktionen **PE.1.3.1** bis **PE.1.3.8** zeigten keine Signale im tieffeldverschobenen Bereich, welche die Wasserstoffbrückenbindung zwischen einer Hydroxy-Gruppe des Phloroglucin-Grundkörpers und der Keto-Funktionalität der Acylseitenkette anzeigen würden. Allerdings waren im Protonenspektrum der Fraktionen **PE.1.3.2** bis **PE.1.3.7** bereits deutliche Triplets bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm zu erkennen, welche ein Indiz für Isopreneinheiten darstellen. Exemplarisch sind diese Signale in **Abbildung 18** für Fraktionen **PE.1.3.2** und **PE.1.3.4** gezeigt.

**PE.1.3.2****PE.1.3.4**

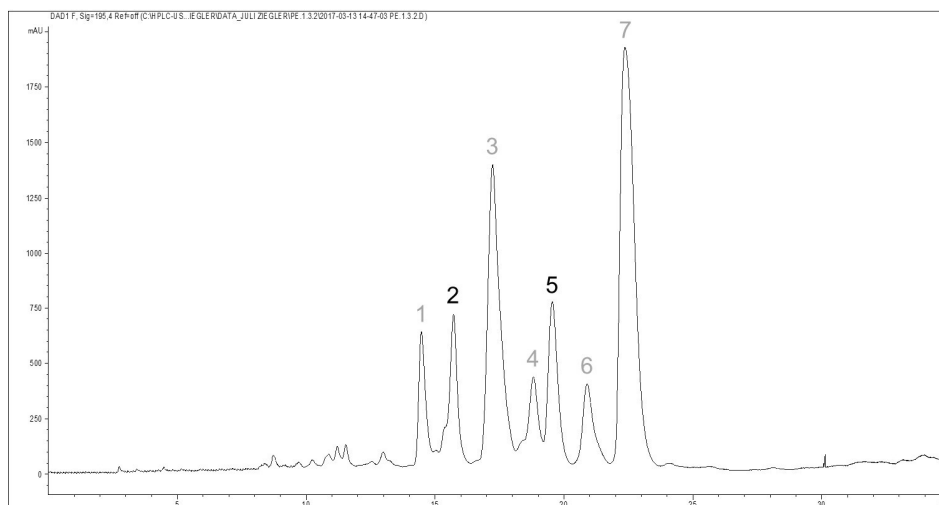
**Abbildung 18**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.1.3.2** und **PE.1.3.4** in  $\text{CDCl}_3$ ; die Pfeile deuten auf die charakteristischen Triplets bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm hin

Für die interessanten Subfraktionen **PE.1.3.2** bis **PE.1.3.7** wurden an der analytischen HPLC Methoden zur Trennung der enthaltenen Komponenten entwickelt. Dabei fiel auf, dass es sich sowohl in den Fraktionen **PE.1.3.4** und **PE.1.3.5** als auch in den Fraktionen **PE.1.3.6** und **PE.1.3.7** um die gleichen Substanzen handelte. Damit erschien es, in Hinblick auf die Isolierung neuer Verbindungen, ausreichend jeweils nur eine der beiden Fraktionen weiterzubearbeiten.

#### **2.2.4.1 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.1.3.2 per semi-präparativer HPLC**

Die weitere Auftrennung der Fraktion **PE.1.3.2** (19,9 mg, 100 - 150 mL) zur Isolierung der enthaltenen Substanzen wurde an einer semi-präparativen HPLC (HPLC II; **Tabelle 15**, S. 35) durchgeführt. Zur Trennung der Komponenten wurde Methode HPLC\_1 (**Tabelle 16**, S. 35) angewendet. Es wurden je Lauf sieben Peaks (**Abbildung 19**) gesammelt, vereinigt, in tarierte Schnappdeckelgläschen überführt, getrocknet und ausgewogen. In **Tabelle 25** sind die Retentionsbereiche der gesammelten Fraktionen sowie deren Auswaagen nach Trocknen unter Stickstoff aufgeführt.

## ISOLIERUNG



**Abbildung 19** HPLC-Chromatogramm von **PE.1.3.2** bei 195 nm (HPLC\_1)

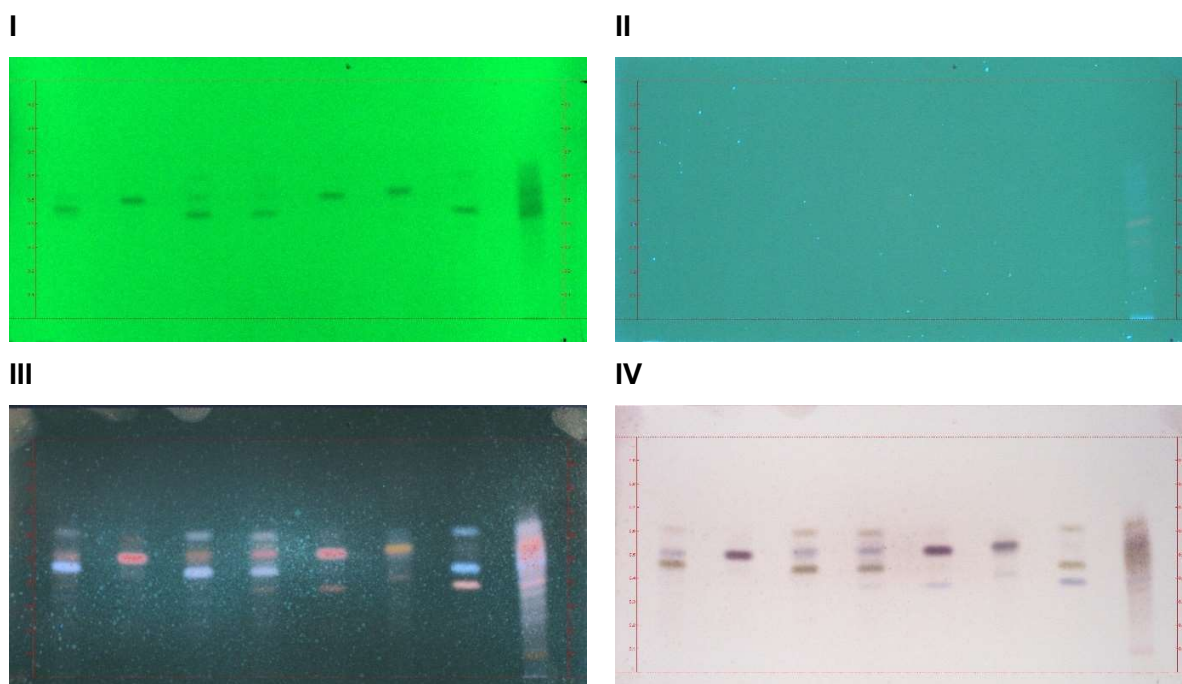
**Tabelle 25** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.1.3.2-1** bis **PE.1.3.2-7**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak              |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.1.3.2-1</b> | -                  | 14,2 - 14,8                                      | <b>0,8</b>              |
| <b>PE.1.3.2-2</b> | <b>Substanz 17</b> | 15,4 - 15,9                                      | <b>1,1</b>              |
| <b>PE.1.3.2-3</b> | -                  | 16,7 - 17,9                                      | <b>2,4</b>              |
| <b>PE.1.3.2-4</b> | -                  | 18,5 - 19,0                                      | <b>0,6</b>              |
| <b>PE.1.3.2-5</b> | <b>Substanz 18</b> | 19,2 - 19,9                                      | <b>1,7</b>              |
| <b>PE.1.3.2-6</b> | -                  | 20,5 - 21,0                                      | <b>0,5</b>              |
| <b>PE.1.3.2-7</b> | -                  | 21,9 - 23,1                                      | <b>3,4</b>              |

Im angefertigten Übersichts-DC (**Abbildung 20**) fällt auf, dass sich die Peaks **PE.1.3.2-1**, **PE.1.3.2-3**, **PE.1.3.2-4** und **PE.1.3.2-7** als gleichartige Doppelbande darstellen, obwohl deren Retentionszeiten mit etwa 14,5, 17,3, 18,8 und 22,5 Minuten an der semi-präparativen HPLC deutlich auseinanderliegen. Es ist eine gut sichtbare, grünlich-braune Bande bei  $R_F \sim 0,45$  und ein andere, weniger intensiv, aber ebenfalls grünlich-braun gefärbte Zone bei  $R_F \sim 0,62$  nach der Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz (**IV** von **Abbildung 20**) zu erkennen. Der Abstand der beiden Banden auf der DC-Platte ist so groß, dass es unwahrscheinlich erscheint, dass sie im HPLC-Lauf gemeinsam eluierten. Viel mehr kann davon ausgegangen werden, dass

es sich bei den vier Isolaten um ähnliche Komponenten mit einem gemeinsamen, instabilen oder reaktiven Strukturmerkmal (untere Bande) und ein Zersetzungs- oder Umlagerungsprodukt (obere Bande) handelt.

Bei Substanz **PE.1.3.2-6** scheint es sich um eine weitestgehend reine Substanz zu handeln, allerdings ist die Auswaage von 0,5 mg zu gering für 2D-NMR-Experimente und somit für die Strukturaufklärung.



**Abbildung 20** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.1.3.2 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Isolate **PE.1.3.2-2** (Substanz **17**) und **PE.1.3.2-5** (Substanz **18**) auf Bahnen 2 und 5, außerdem PE.1.3.2-1 (Bahn 1), PE.1.3.2-3 (Bahn 3), PE.1.3.2-4 (Bahn 4), PE.1.3.2-6 (Bahn 6), PE.1.3.2-7 (Bahn 7) und PE.1.3.2-Rest (Bahn 8) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

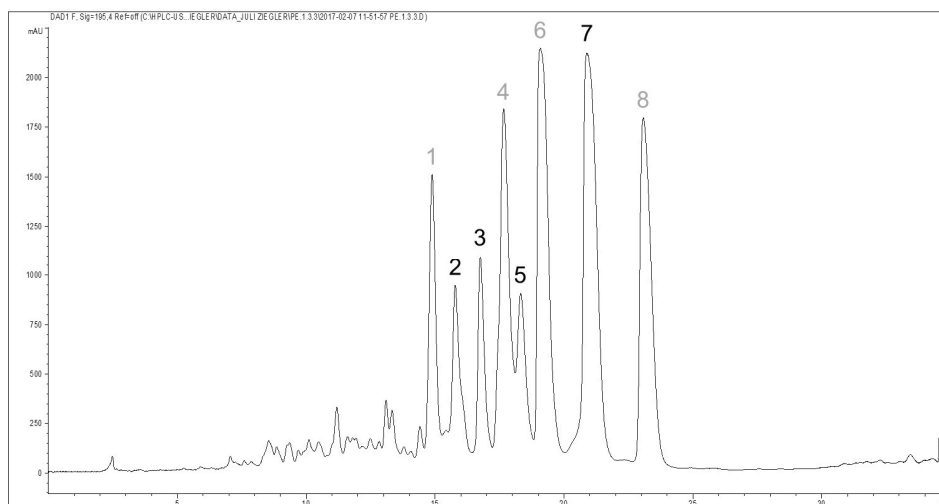
Das DC-Chromatogramm zeigt nach Besprühen der Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz auf Bahn 2 bei  $R_F \sim 0,50$  eine rote (366 nm) bzw. lila Bande (Vis), die fluoreszenzlöschende Eigenschaften besitzt (254 nm) und Substanz **17** darstellt. Laut HPLC konnte die Verbindung mit einer Reinheit von 83,5 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) isoliert werden. Substanz **18** zeigte die gleiche Färbung und war auf Bahn 5 ( $R_F \sim 0,52$ ) zu finden. Per HPLC wurde eine Reinheit von 89,6 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) für das Isolat bestimmt. Aufgrund vergleichbarer  $R_F$ -Werte und Färbung auf der DC-Platte kann vermutet werden, dass es sich bei den beiden Sub-



stanzen um ein korrespondierendes Paar von Acylphloroglucinolen mit unterschiedlichen Acylresten handelt. Substanz **18** muss dabei lipophiler sein, da es an der semi-präparativen HPLC später eluiert und auf dem Kieselgel-DC einen etwas höheren  $R_F$ -Wert aufweist.

#### 2.2.4.2 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.1.3.3 per semi-präparativer HPLC

Für die semi-präparative Trennung (HPLC II, **Tabelle 15**, S. 35) von **PE.1.3.3** (45,3 mg, 150 - 245 mL) fand die gleiche Methode wie auch schon bei Fraktion **PE.1.3.2** (HPLC\_1, **Tabelle 16**, S. 35) Verwendung. Durch isokratische Elution mit Acetonitril 90 % (V/V) konnten acht Verbindungen (**Abbildung 21**) voneinander getrennt werden, deren Retentionszeiten und Auswaagen in **Tabelle 26** aufgeführt sind.

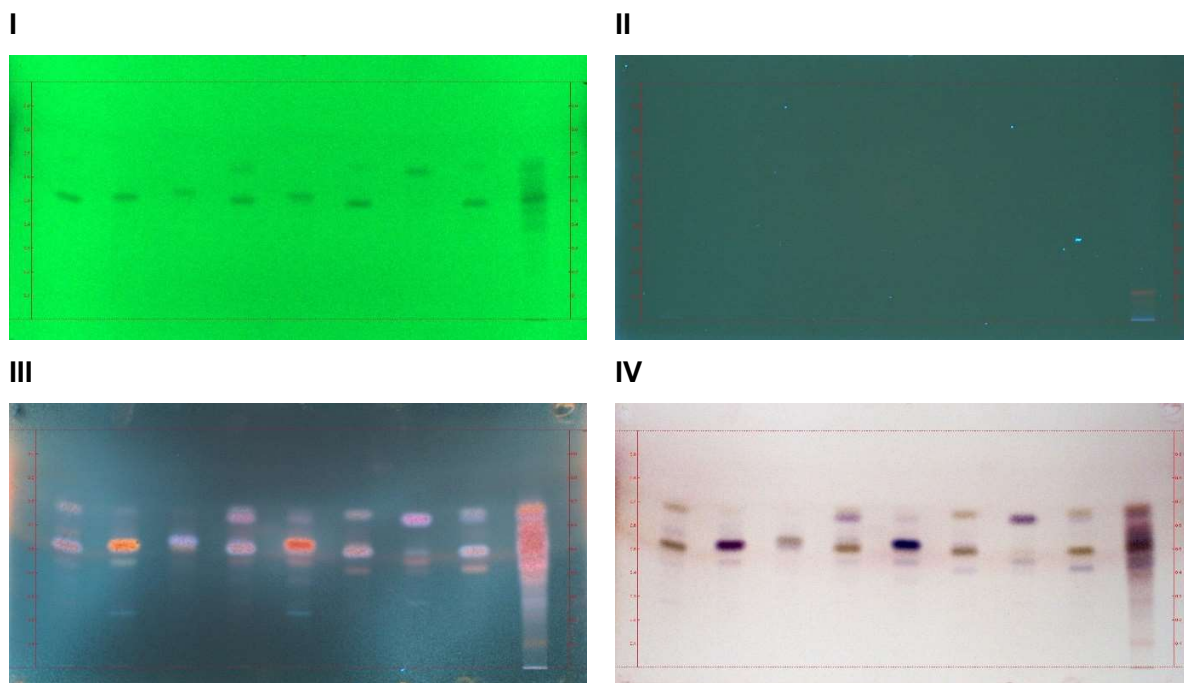


**Abbildung 21** HPLC-Chromatogramm von **PE.1.3.3** bei 195 nm (HPLC\_1)

**Tabelle 26** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.1.3.3-1** bis **PE.1.3.3-8**) an der semi-präparativen HPLC

| <b>Peak</b>       |                    | <b>Retentionsbereich [Min]</b><br>semi-präparative HPLC | <b>Auswaage [mg]</b><br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|---|--------------------------------|
| <b>PE.1.3.3-1</b> | -                  | 14,7 - 15,3   | <b>2,1</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-2</b> | <b>Substanz 22</b> | 15,7 - 16,0   | <b>1,4</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-3</b> | <b>Substanz 21</b> | 16,6 - 17,2   | <b>2,0</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-4</b> | -                  | 17,4 - 18,0   | <b>3,1</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-5</b> | <b>Substanz 23</b> | 18,3 - 18,8   | <b>2,0</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-6</b> | -                  | 19,0 - 19,7   | <b>4,6</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-7</b> | <b>Substanz 14</b> | 20,7 - 21,7   | <b>5,4</b>                     |
| <b>PE.1.3.3-8</b> | -                  | 22,9 - 23,8   | <b>4,0</b>                     |

Auf den ersten Blick ähnelt das Übersichts-DC (**Abbildung 22**) sehr dem der vorhergehenden Isolate, da vier der acht Substanzen, **PE.1.3.3-1**, **PE.1.3.3-4**, **PE.1.3.3-6** und **PE.1.3.3-8**, abermals als Doppelbande mit  $R_F \sim 0,50$  und  $0,68$  dargestellt sind. Die fast identischen Retentionszeiten der Komponenten bei der Aufreinigung und der vergleichbare Abstand der  $R_F$ -Werte der beiden Banden lassen darauf schließen, dass hier dieselben Inhaltsstoffe wie aus **PE.1.3.2** isoliert wurden.



**Abbildung 22** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.1.3.3 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.1.3.3-2** (Substanz **22**), **PE.1.3.3-3** (Substanz **21**), **PE.1.3.3-5** (Substanz **23**) und **PE.1.3.3-7** (Substanz **14**) auf den Bahnen 2, 3, 5 und 7, außerdem PE.1.3.3-1 (Bahn 1), PE.1.3.3-4 (Bahn 4), PE.1.3.3-6 (Bahn 6), PE.1.3.3-8 (Bahn 8) und PE.1.3.3-Rest (Bahn 9) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

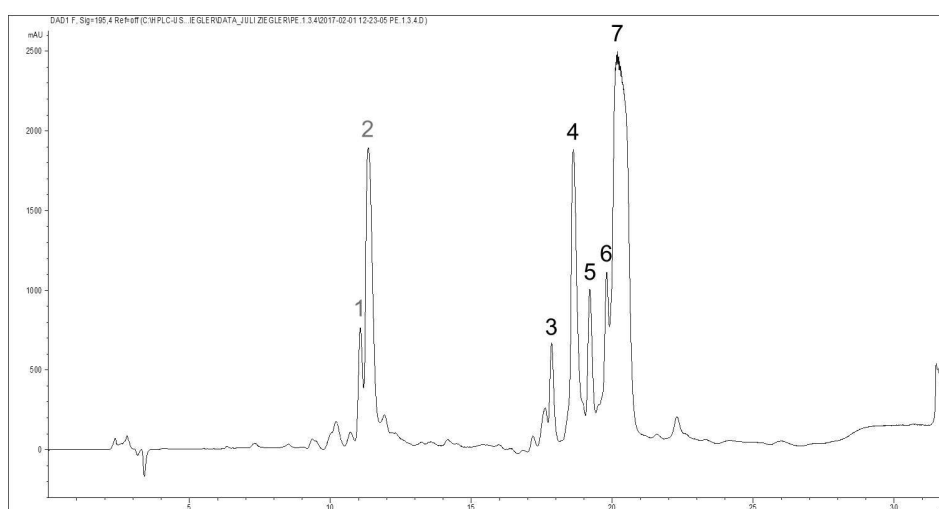
Die rot- bzw. lila-gefärbte Zone auf Bahn 2 (AAS, 366 nm bzw. Vis) konnte mit einer Reinheit von 89,6 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) isoliert und mithilfe von NMR- und Massedaten als Substanz **22** identifiziert werden. Die gräulich-grüne Bande (AAS, Vis) auf Bahn 3 mit einem  $R_F$ -Wert von 0,55 entspricht Substanz **21** und weist eine Reinheit von 83,0 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) auf. Substanz **23**, deren Reinheit bei 70,7 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) liegt, ist auf Bahn 5 zu finden und erscheint nach Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz intensiv rot (366 nm) bzw. lila gefärbt (Vis). Hinter der lilafarbenen Zone (AAS, 366 nm und Vis) auf Bahn 7 verbirgt sich Substanz **14**, welche eine Reinheit von 83,5 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) aufweist und mit einem  $R_F$ -Wert von 0,65 die höchste Lipophilie der hier isolierten Substanzen besitzt. Alle Verbindungen weisen Fluoreszenzlöschung bei 254 nm auf, eine Eigenfluoreszenz bei 366 nm ist allerdings nicht auszumachen.

Auch in diesem DC stellen sich wieder zwei Banden, auf Bahn 2 und 5, nach Derivatisierung sehr ähnlich dar. Zusammen mit den vergleichbaren  $R_F$ -Werten ( $R_F$  0,52 und 0,55) liegt die Vermutung

nahe, dass es sich auch hier um analoge Acylphloroglucinole handelt, die sich lediglich in der Acyluntereinheit unterscheiden, wobei Substanz **22** die hydrophilere der beiden ist.

### 2.2.4.3 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.1.3.4 per semi-präparativer HPLC

Die Aufreinigung von **PE.1.3.4** (89,2 mg, 245 - 370 mL) erfolgte an der semi-präparativen HPLC (HPLC II, **Tabelle 15**, S. 35) mittels der Methode HPLC\_2 (**Tabelle 16**, S. 35) und ergab sieben Verbindungen (**Abbildung 23**). Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks sind in **Tabelle 27** aufgeführt.



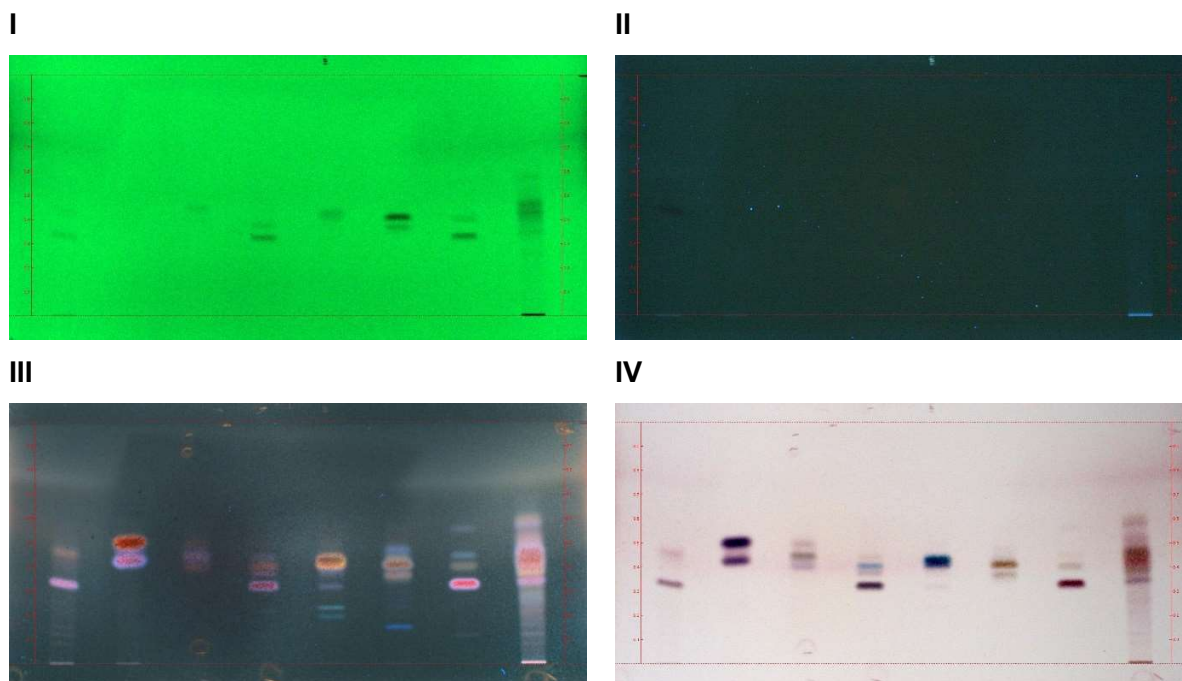
**Abbildung 23** HPLC-Chromatogramm von **PE.1.3.4** bei 195 nm (HPLC\_2)

**Tabelle 27** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.1.3.4-1** bis **PE.1.3.4-7**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak              |                       | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|-----------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.1.3.4-1</b> | -                     | 10,9 - 11,1                                      | <b>0,5</b>              |
| <b>PE.1.3.4-2</b> | -                     | 11,2 - 11,6                                      | <b>1,5</b>              |
| <b>PE.1.3.4-3</b> | <b>Substanz 20</b>    | 17,7 - 18,0                                      | <b>2,3</b>              |
| <b>PE.1.3.4-4</b> | <b>Substanz 10</b>    | 18,5 - 18,9                                      | <b>5,2</b>              |
| <b>PE.1.3.4-5</b> | <b>Substanz 24/25</b> | 19,1 - 19,4                                      | <b>2,8</b>              |
| <b>PE.1.3.4-6</b> | <b>Substanz 3</b>     | 19,7 - 19,9                                      | <b>2,1</b>              |
| <b>PE.1.3.4-7</b> | <b>Substanz 12</b>    | 20,0 - 20,8                                      | <b>34,6</b>             |

Das angefertigte Übersichts-DC zeigt auf Bahn 3 eine gräulich-grüne Bande (AAS, Vis) bei  $R_F$  0,44, welche Substanz **20** mit einer Reinheit von 77,5 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) entspricht. Die intensiv lila-gefärbte Zone (AAS, Vis) von **PE.1.3.4-4** bei  $R_F$  0,33 stellt Substanz **10** dar und weist eine Reinheit von 85,9 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) auf. Ein Gemisch aus den beiden Diastereomeren **24/25** ist auf Bahn 5 zu finden. Die Verbindungen weisen einen  $R_F$  von 0,42 auf und färben sich mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz kräftig orange/braun (366 nm) bzw. blau (Vis). 79,0 % Reinheit (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) wies Substanz **3** auf Bahn 6 bei  $R_F$  0,40 auf, welche bei Derivatisierung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz als orangefarbene Bande erscheint. Bei der Zone von **PE.1.3.4-7** mit einem  $R_F$ -Wert von 0,34 handelt es sich um Substanz **12**, die mit 92,3 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) sehr sauber isoliert werden konnte. Auf dem DC wird die Verbindung als pinke Bande (AAS, 366 nm und Vis) detektiert.

Alle isolierten Komponenten weisen fluoreszenzlöschende Eigenschaften (254 nm) auf, jedoch keine Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Lediglich auf Bahn 1 ist bei 366 nm eine dunkle Bande von **PE.1.3.4-1** bei  $R_F$  0,33 zu erkennen. Es konnten allerdings nur 0,5 mg der Substanz isoliert und somit die Struktur bedauerlicherweise nicht aufgeklärt werden.



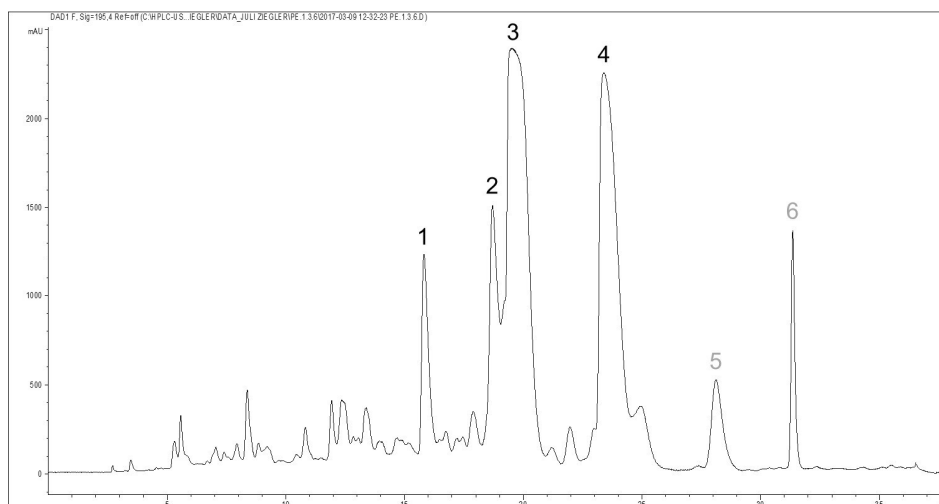
**Abbildung 24** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.1.3.4 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.1.3.4-3** (Substanz **20**), **PE.1.3.4-4** (Substanz **10**), **PE.1.3.4-5** (Substanzen **24/25**), **PE.1.3.4-6** (Substanz **3**) und **PE.1.3.4-7** (Substanz **12**) auf den Bahnen 3 bis 7, außerdem PE.1.3.4-1 (Bahn 1), PE.1.3.4-2 (Bahn 2) und PE.1.3.4-Rest (Bahn 8) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

#### 2.2.4.4 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.1.3.6 per semi-präparativer HPLC

Die Aufreinigung von Fraktion **PE.1.3.6** (22,9 mg, 520 - 600 mL) wurde an der semi-präparativen HPLC (HPLC II, **Tabelle 15**, S. 35) mittels Methode HPLC\_3 (**Tabelle 16**, S. 35) durchgeführt, wodurch sechs Substanzen getrennt und gesammelt werden konnten.

Nach Vereinigen der Läufe, Einengen des Lösungsmittels, Überführen in tarierte Schnappdeckelgläserchen, Trocknen unter Stickstoff und anschließendes Wiegen ergaben sich die in **Tabelle 28** aufgeführten Auswaagen.

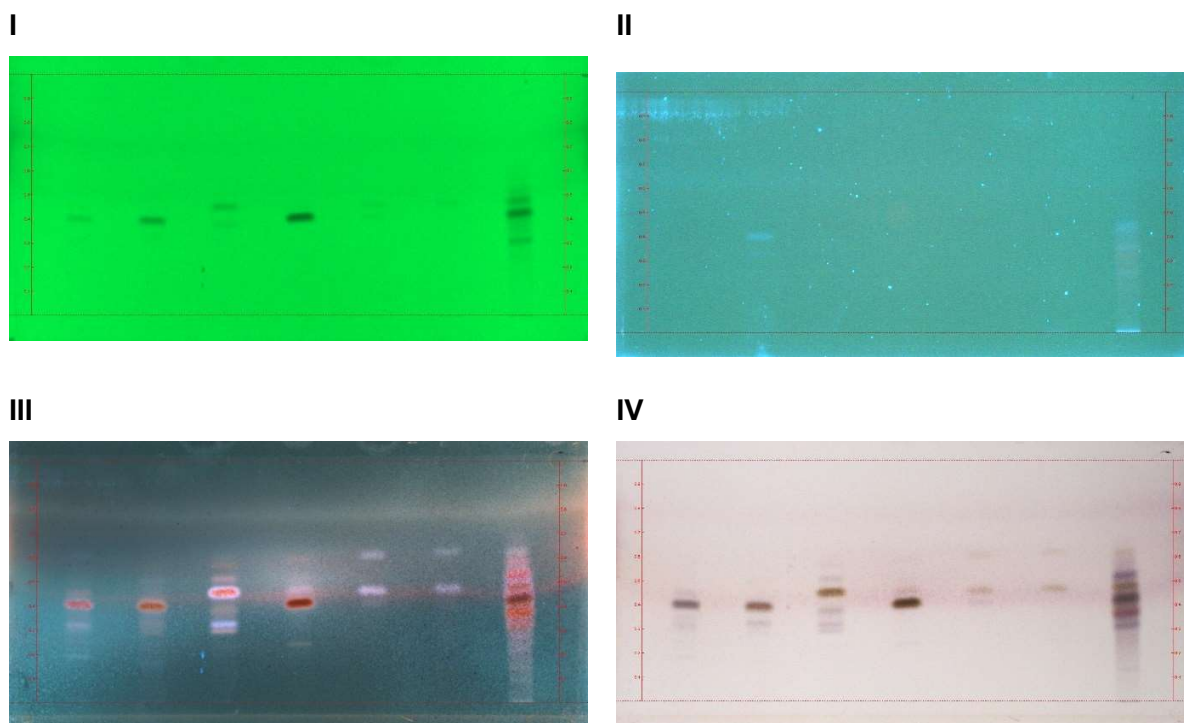


**Abbildung 25** HPLC-Chromatogramm von **PE.1.3.6** bei 195 nm (HPLC\_3)

**Tabelle 28** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.1.3.6-1** bis **PE.1.3.6-6**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak              |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.1.3.6-1</b> | <b>Substanz 19</b> | 15,6 - 16,3                                      | <b>1,4</b>              |
| <b>PE.1.3.6-2</b> | <b>Substanz 2</b>  | 18,5 - 19,0                                      | <b>1,7</b>              |
| <b>PE.1.3.6-3</b> | <b>Substanz 11</b> | 19,3 - 20,6                                      | <b>6,3</b>              |
| <b>PE.1.3.6-4</b> | <b>Substanz 1</b>  | 23,1 - 24,3                                      | <b>4,0</b>              |
| <b>PE.1.3.6-5</b> | -                  | 27,8 - 28,6                                      | <b>1,3</b>              |
| <b>PE.1.3.6-6</b> | -                  | 31,2 - 31,6                                      | <b>1,0</b>              |

Im Übersichts-DC stellt sich die Isolierung folgendermaßen dar:



**Abbildung 26 Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.1.3.6 mittels semi-präparativer HPLC**

Dargestellt sind die Substanzen **PE.1.3.6-1** (Substanz **19**), **PE.1.3.6-2** (Substanz **2**), **PE.1.3.6-3** (Substanz **11**) und **PE.1.3.6-4** (Substanz **1**) auf den Bahnen 1 bis 4, außerdem PE.1.3.6-5 (Bahn 5), PE.1.3.6-6 (Bahn 6) und PE.1.3.6-Rest (Bahn 7) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Nach Besprühen der DC-Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz ist auf Bahn 1 eine gräuliche Bande mit einem  $R_F$  0,40 zu sehen, welche Substanz **19** darstellt und mit 90,0%iger Reinheit (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) isoliert werden konnte. Die strukturell ähnlichen Substanzen **1** und **2** wurden als **PE.1.3.6-2** und **-4** eluiert und erscheinen als braune Zone ebenfalls bei  $R_F$  0,40. Die Substanzen liegen zu 79,2 % bzw. 90,5 % rein (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) vor. Auf Bahn 3 zeigt sich Substanz **11** als gelblich-braune (AAS/Vis) Bande bei  $R_F$  0,45. Per HPLC wurde eine Reinheit von 60,8 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) bestimmt.

Alle isolierten Substanzen weisen fluoreszenzlöschende Eigenschaften bei 254 nm auf und auf Bahn 2 ist außerdem eine hellblaue Eigenfluoreszenz von Substanz **2** auszumachen. Auf Bahnen 5 und 6 ist abermals eine charakteristische Doppelbande zu erkennen.



### 2.2.5 Fraktionierung von PE.1.4 per CPC

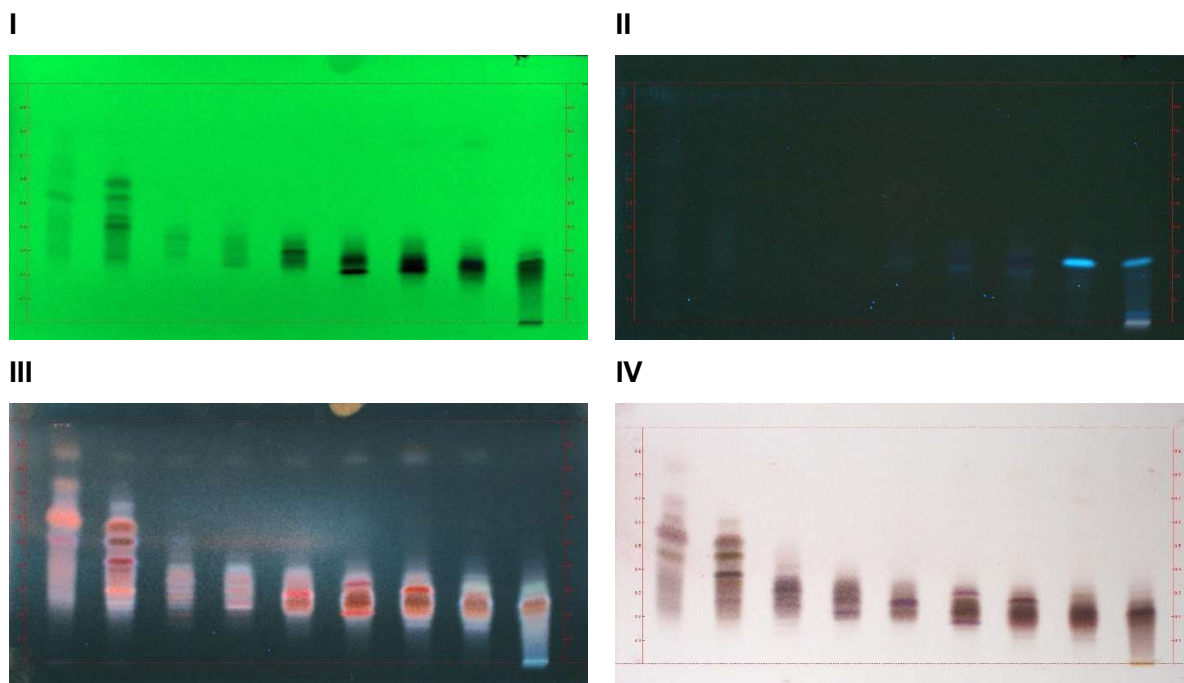
Fraktion **PE.1.4** (533,1 mg) wurde an der CPC mithilfe der Methode CPC\_2 (**Tabelle 12**, S. 31) im aufsteigenden Modus fraktioniert, was zu acht Unterfraktionen (**PE.1.4.1** bis **PE.1.4.8**) führte. Anschließend wurde für 90 Minuten in den absteigenden Modus gewechselt und diese Reagenzgläser zu einer Fraktion, **PE.1.4.descending**, vereinigt. Die letzte Fraktion, **PE.1.4.MeOH**, kam durch das Ausspülen des Gerätes mit Methanol zustande.

Elutionsbereiche und Auswaagen der entstandenen Fraktionen sind in **Tabelle 29** zu finden.

**Tabelle 29** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.1.4.1** bis **PE.1.4.8** sowie **PE.1.3.descending** und **PE.1.3.MeOH**) an der CPC

| Fraktion                 | Elutionsbereich [mL] | Auswaage [mg] |
|--------------------------|----------------------|---------------|
|                          | CPC                  | Gesamt        |
| <b>PE.1.4.1</b>          | 0 - 130              | <b>15,1</b>   |
| <b>PE.1.4.2</b>          | 130 - 190            | <b>14,9</b>   |
| <b>PE.1.4.3</b>          | 190 - 325            | <b>74,0</b>   |
| <b>PE.1.4.4</b>          | 325 - 430            | <b>65,6</b>   |
| <b>PE.1.4.5</b>          | 430 - 685            | <b>106,9</b>  |
| <b>PE.1.4.6</b>          | 685 - 860            | <b>32,5</b>   |
| <b>PE.1.4.7</b>          | 860 - 1115           | <b>34,4</b>   |
| <b>PE.1.4.8</b>          | 1115 - 1285          | <b>11,8</b>   |
| <b>PE.1.4.descending</b> | 1285 - 1780          | <b>32,3</b>   |
| <b>PE.1.4.MeOH</b>       |                      | <b>0,5</b>    |

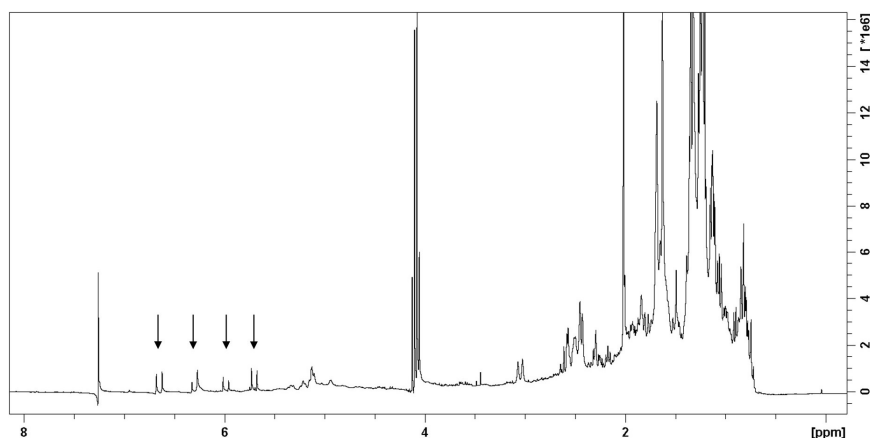
Anhand des angefertigten Übersicht-DCs (**Abbildung 27**) wird ersichtlich, dass fast alle gewonnenen Fraktionen, ausgenommen **PE.1.4.1** und **PE.1.4.2**, sehr ähnlich aussehen und es schwierig ist, eindeutig getrennte Banden auszumachen.



**Abbildung 27 Übersichts-DC nach der Fraktionierung von PE.1.4 mittels CPC**

Dargestellt sind die Fraktionen **PE.1.4.1** bis **PE.1.4.8** (Bahnen 1 bis 8), sowie **PE.1.4.descending** (Bahn 9) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

In den NMR-Protonenspektren der Fraktionen konnten keine Hinweise für die Anwesenheit von Acylphloroglucinolen gefunden werden. Allerdings waren für Fraktion **PE.1.4.3** charakteristische Dubletts im Bereich von 5,5 - 6,5 ppm zu erkennen. Diese deuten olefinische Protonen an, wie sie beispielsweise in einer Isopreneinheit mit verschobener Doppelbindung von C-2/C-3 zu C-1/C-2 zu finden sind (**Abbildung 28**).

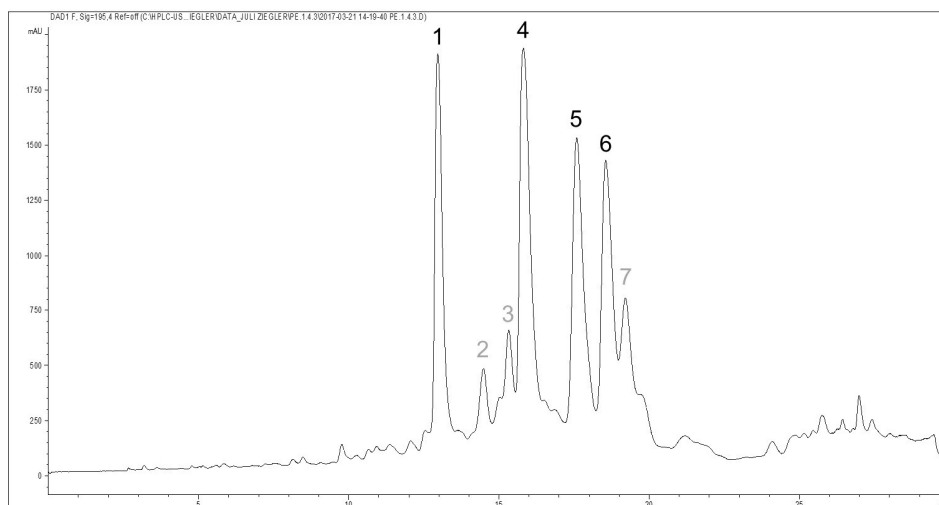


**Abbildung 28**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.1.4.3** in  $\text{CDCl}_3$ ; die Pfeile deuten auf die auffälligen Dubletts bei  $\delta_{\text{H}}$  5,5 - 6,5 ppm hin

Auch die Entwicklung einer geeigneten Methode zur Auftrennung der enthaltenen Inhaltsstoffe an der analytischen HPLC blieb für alle Fraktionen (bis auf **PE.1.4.3**) erfolglos, da keine getrennten Peaks von ausreichender Intensität detektiert werden konnten.

#### 2.2.5.1 Isolierung von Reinsubstanzen aus **PE.1.4.3** per semi-präparativer HPLC

Auch die Aufreinigung von Fraktion **PE.1.4.3** (74,0 mg, 190 - 325 mL) wurde an einer semi-präparativen HPLC (HPLC II, **Tabelle 15**, S. 35) durchgeführt. Bearbeitet wurde die Fraktion mit einem System aus Acetonitril und Wasser an RP18-Material (HPLC\_4, **Tabelle 16**, S. 35). Mittels isokratischer Elution mit Acetonitril 80 % (V/V) konnten sieben Signale voneinander getrennt werden (**Abbildung 29**). Es ergaben sich die in **Tabelle 30** aufgeführten Retentionszeiten und Auswaagen.



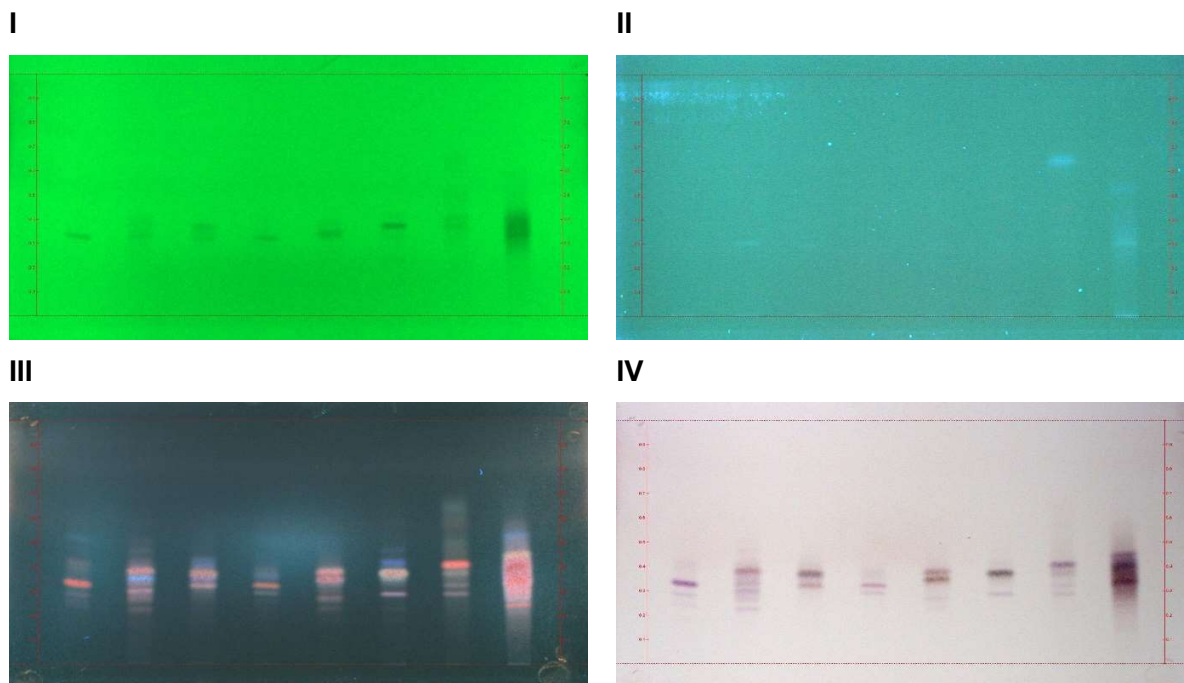
**Abbildung 29** HPLC-Chromatogramm von **PE.1.4.3** bei 195 nm (HPLC\_4)

**Tabelle 30** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.1.4.3-1** bis **PE.1.4.3-7**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak              |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.1.4.3-1</b> | <b>Substanz 8</b>  | 12,7 - 13,3                                      | <b>5,0</b>              |
| <b>PE.1.4.3-2</b> | -                  | 14,3 - 14,7                                      | <b>1,3</b>              |
| <b>PE.1.4.3-3</b> | -                  | 15,2 - 15,5                                      | <b>1,4</b>              |
| <b>PE.1.4.3-4</b> | <b>Substanz 9</b>  | 15,6 - 16,3                                      | <b>7,2</b>              |
| <b>PE.1.4.3-5</b> | <b>Substanz 16</b> | 17,3 - 18,2                                      | <b>4,5</b>              |
| <b>PE.1.4.3-6</b> | <b>Substanz 13</b> | 18,3 - 19,0                                      | <b>4,1</b>              |
| <b>PE.1.4.3-7</b> | -                  | 19,0 - 19,6                                      | <b>2,8</b>              |

Im Übersichts-DC (**Abbildung 30**) waren, vor allem nach Besprühen der Platte mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz bei 366 nm (**III**), in jeder Fraktion neben einer Hauptbande noch Nebenbanden zu erkennen. Dies ist auf die kurz aufeinanderfolgende Elution der Substanzen zurückzuführen. Außerdem handelt es sich bei Anisaldehyd/Schwefelsäure um ein sehr unspezifisches Derivatisierungsreagenz, das sehr viele unterschiedliche Verbindungen anzufärben vermag. Trotz der scheinbar ausgeprägten Verunreinigungen konnten die Strukturen der Substanzen auf Bahnen 1, 4, 5 und 6 zweifelsfrei aufgeklärt werden. Angemerkt werden muss hierbei

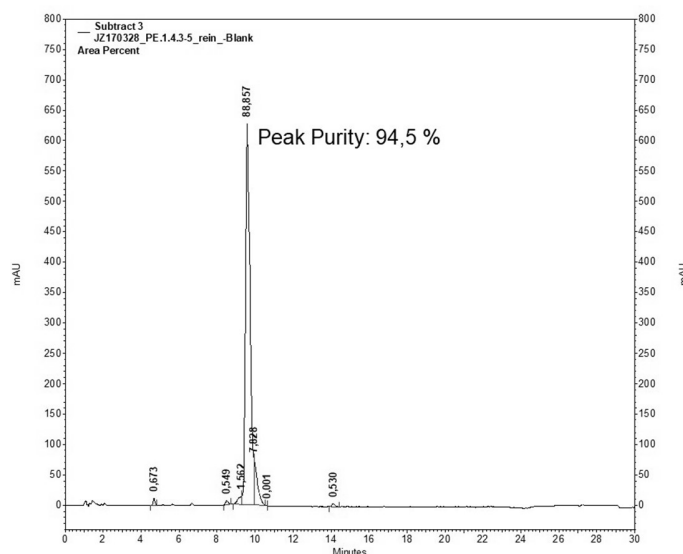
auch, dass von mehr oder weniger ausgeprägter Fluoreszenz nicht auf die Reinheit der Komponente geschlossen werden kann.



**Abbildung 30** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.1.4.3 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.1.4.3-1** (Substanz **8**), **PE.1.4.3-4** (Substanz **9**), **PE.1.4.3-5** (Substanz **16**) und **PE.1.4.3-6** (Substanz **13**) auf den Bahnen 1 und 4 bis 6, außerdem PE.1.4.3-2 (Bahn 2), PE.1.4.3-3 (Bahn 3), PE.1.4.3-7 (Bahn 7) und PE.1.4.3-Rest (Bahn 8) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Auf den Bahnen 1 und 4 konnte nach Derivatisierung eine intensiv rot (366 nm) oder violett (Vis) gefärbte Bande bei  $R_F$  0,35 detektiert werden, die den Substanzen **8** und **9** entspricht. Wie bereits einige Male zuvor sprach die auffallende Ähnlichkeit der beiden Signale für zwei gleiche Acylphloglucinole mit unterschiedlichem Acylrest. Aufgrund verzögerter Elution an der semi-präparativen HPLC muss es sich bei Substanz **9** um das lipophilere Derivat handeln. An der HPLC wurde eine Reinheit von 90,2 % bzw. 81,4 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) für die beiden Verbindungen bestimmt. Zwei Banden gleicher Intensität mit einem  $R_F$ -Wert von  $\sim 0,4$  findet man auf Bahn 5. Per analytischer HPLC konnte jedoch eine Reinheit von 88,6 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) bei einer Peak Purity von 94,5 % für Substanz **16** ermittelt werden (**Abbildung 31**).



**Abbildung 31** Chromatogramm der Reinheitsbestimmung für Substanz **16 (PE.1.4.3-5)**, dargestellt als MaxPlot und ermittelter Peak Purity

## 2.2.6 Fraktionierung von PE.2 mittels Flash-Chromatographie

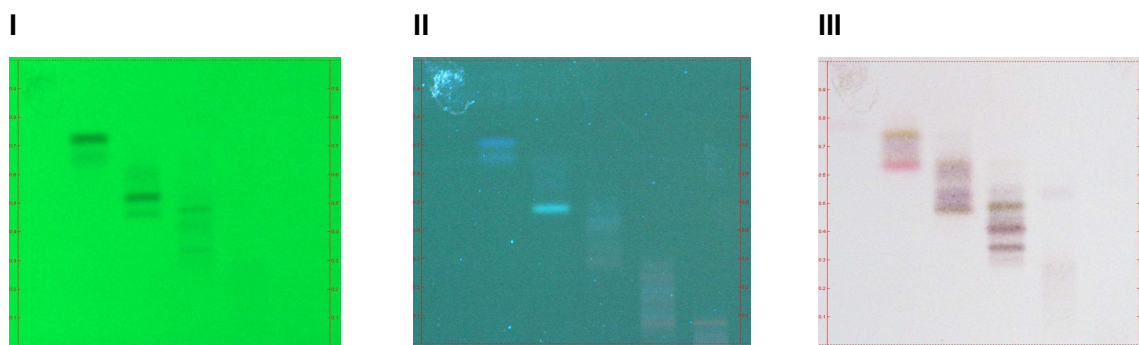
5,9 g von **PE.2** (Methanol 100 %) wurden in 2 Läufen per Flash Chromatographie aufgetrennt. Beim ersten Lauf wurden 2,2, beim zweiten 3,7 g in wenig Hexan gelöst und am Rotationsverdampfer auf 4,1 bzw. 8,7 g Kieselgel aufgezogen. Die Fraktion wurde analog **PE.1** mittels linearem Gradienten von 100 % Hexan auf 100 % Ethylacetat innerhalb einer Stunde grob aufgetrennt und die Säule abschließend 15 Minuten lang mit Methanol 100 % gesäubert (Flash\_2, **Tabelle 10**, S. 29). Wie bereits bei der Fraktionierung von **PE.1** erläutert, wurde beim Reinigungsschritt mit Methanol 100 % das Säulenbett teilweise gelöst und ebenfalls eluiert, was die sehr hohe Auswaage der Spülfraction (**PE.2.MeOH**) erklärt. Anhand Kontroll-DCs konnten die Fraktionen zu sechs Unterfraktionen (**PE.2.1** bis **PE.2.6**) zusammengefasst werden. Die jeweiligen Elutionsbereiche und Auswaagen sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt (**Tabelle 31**).

## ISOLIERUNG

**Tabelle 31** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.2.1** bis **PE.2.6** und **PE.2.MeOH**) an Kieselgel-Flash-Chromatographie

| Fraktion         | Elutionsbereich [mL] |             | Auswaage [mg] |         | Auswaage [mg] |
|------------------|----------------------|-------------|---------------|---------|---------------|
|                  | Flash 1              | Flash 2     | Flash 1       | Flash 2 | Gesamt        |
| <b>PE.2.1</b>    | 0 - 300              | 0 - 280     | 17,5          | 22,5    | <b>40,0</b>   |
| <b>PE.2.2</b>    | 300 - 420            | 280 - 400   | 174,4         | 289,9   | <b>464,3</b>  |
| <b>PE.2.3</b>    | 420 - 540            | 400 - 540   | 343,2         | 421,6   | <b>764,8</b>  |
| <b>PE.2.4</b>    | 540 - 840            | 540 - 800   | 758,4         | 1216,6  | <b>1975,0</b> |
| <b>PE.2.5</b>    | 840 - 1360           | 800 - 1440  | 302,5         | 694,0   | <b>996,5</b>  |
| <b>PE.2.6</b>    | 1360 - 1800          | 1440 - 1800 | 110,4         | 104,7   | <b>215,1</b>  |
| <b>PE.2.MeOH</b> | 1800 - 2250          | 1800 - 2250 | 325,8         | 533,5   | <b>859,3</b>  |

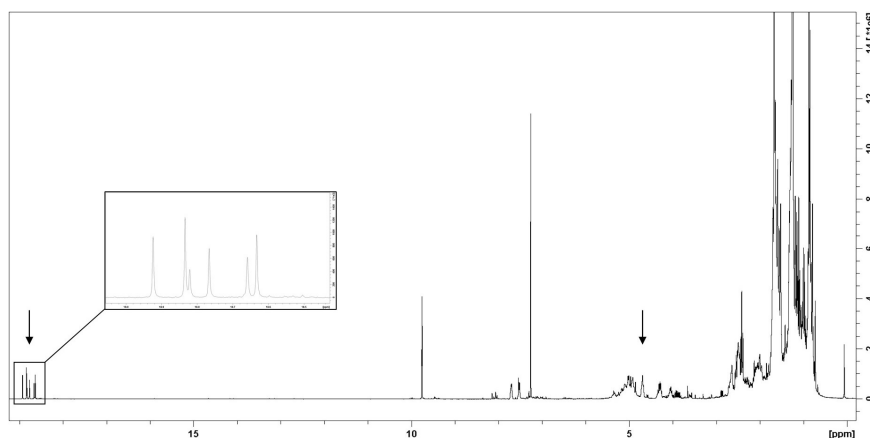
Das angefertigte Übersichts-DC (**Abbildung 32**) verdeutlicht die gute Auftrennung der enthaltenen Komponenten entsprechend steigender Polarität.



**Abbildung 32** Übersichts-DC nach der Fraktionierung von **PE.2** an Kieselgel mittels Flash-Chromatographie  
Dargestellt sind die Fraktionen **PE.2.1** bis **PE.2.6** (Bahnen 1 bis 6) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei Tageslicht (**III**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Die Auswaage der Fraktion **PE.2.1** war mit 40,0 mg nur sehr gering und enthielt Substanzen, die auf der DC-Platte selbst nach Derivatisierung nicht sichtbar gemacht werden konnten. Die Fraktionen **PE.2.2** bis **PE.2.4** wiesen zahlreiche scharfe Banden auf, die sich nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz (**III**) in den unterschiedlichsten Farben darstellten. Besonders interessant erschien die orange-braune Bande auf Bahn 2 mit einem  $R_F$ -Wert von 0,77, die sowohl ausgeprägte Fluoreszenzlöschung (254 nm) als auch dunkelblaue Eigenfluoreszenz

(366 nm) zeigte. Auch das Protonenspektrum dieser Fraktion sah vielversprechend aus, da neben den bereits bekannten Signalen  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm deutliche Singulettis im tieffeldverschobenen Bereich ( $\delta_{\text{H}} > 18$  ppm) zu erkennen waren (**Abbildung 33**).



**Abbildung 33**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.2.2** in  $\text{CDCl}_3$  mit vergrößertem Ausschnitt der Signale  $>18$  ppm; die Pfeile deuten auf ein charakteristisches Triplet bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm und auffällige Singulettis  $\delta_{\text{H}} > 18$  ppm hin

### 2.2.7 Fraktionierung von PE.2.2 mittels CPC

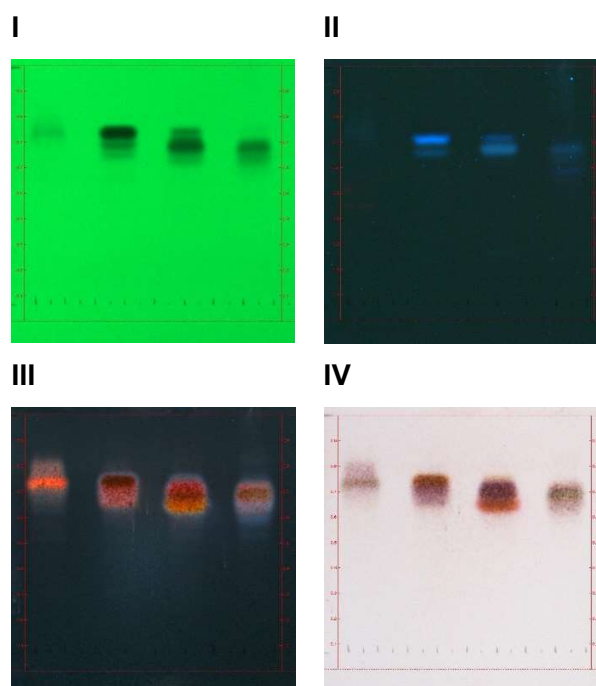
Die Fraktion **PE.2.2** (44,3 mg, Flash 1 und 2: 300 - 420 mL, 280 - 400 mL) wurde in einem zweiten Fraktionierungsschritt mittels Flüssig-flüssig-Verteilungschromatographie aufgetrennt. Das verwendete zwei-Phasen-System bestand aus Heptan, Acetonitril und Methanol (CPC\_3, **Tabelle 12**, S. 31). Im absteigenden Modus wurden vier Unterfraktionen (**PE.2.1** bis **PE.2.4**) erhalten. **Tabelle 32** fasst die Elutionsbereiche und die erhaltenen Auswaagen der getrockneten Fraktionen zusammen.

**Tabelle 32** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.2.2.1** bis **PE.2.2.4**) an der CPC

| Fraktion        | Elutionsbereich [mL] | Auswaage [mg] |
|-----------------|----------------------|---------------|
|                 | CPC                  | Gesamt        |
| <b>PE.2.2.1</b> | 0 - 100              | <b>78,2</b>   |
| <b>PE.2.2.2</b> | 100 - 162            | <b>84,3</b>   |
| <b>PE.2.2.3</b> | 162 - 258            | <b>30,0</b>   |
| <b>PE.2.2.4</b> | 258 - 1068           | <b>44,6</b>   |



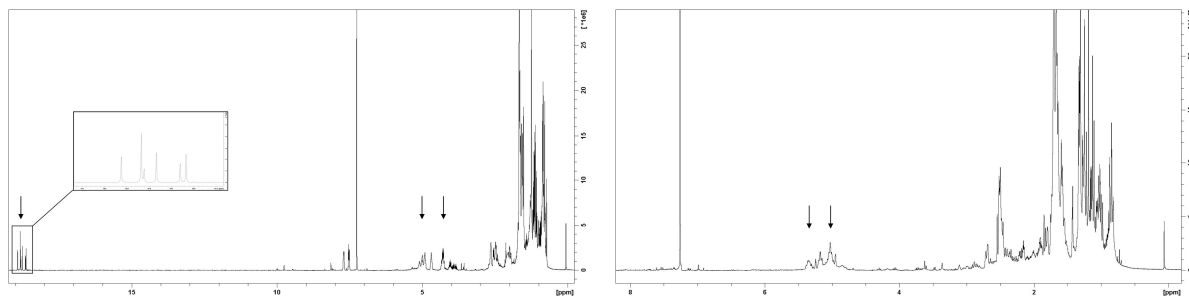
In der Übersichts-DC (**Abbildung 34**) war die auffallende Bande mit dunkelblauer Eigenfluoreszenz wieder auf Bahn 2 zu finden. Auf Bahn 3 färbte sich auch eine Zone ( $R_F$  0,68) intensiv orange mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz. Das zugehörige  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte allerdings keine Anzeichen für Acylphloroglucinole und die Methodenentwicklung an der analytischen HPLC ergab zahlreiche Verbindungen für Fraktion **PE.2.2.3**, bei nur 30,0 mg Auswaage. Im Allgemeinen konnte aufgrund der hohen  $R_F$ -Werte festgestellt werden, dass die Verbindungen vermutlich lipophiler sind als die der vorhergehenden Fraktionen.



**Abbildung 34** Übersichts-DC nach der Fraktionierung von **PE.2.2** mittels CPC

Dargestellt sind die Fraktionen **PE.2.2.1** bis **PE.2.2.4** (Bahnen 1 bis 4) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

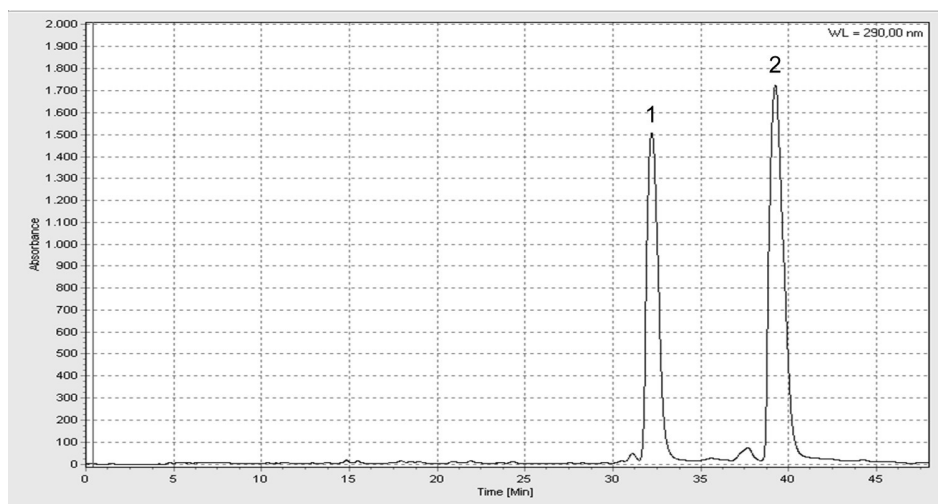
Das Protonenspektrum von **PE.2.2.2** wies wieder sechs Singulets im Tieffeld auf und auch in dem von **PE.2.2.4** ließen sich Signale von Isopreneinheiten vermuten (**Abbildung 35**).

**PE.2.2.2****PE.2.2.4**

**Abbildung 35**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.2.2.2** und **PE.2.2.4** in  $\text{CDCl}_3$  mit vergrößertem Ausschnitt der Signale  $>18$  ppm; die Pfeile deuten auf charakteristische Triplets bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm und auffällige Singulets  $\delta_{\text{H}} >18$  ppm hin

### 2.2.7.1 Isolierung von Reinsubstanzen aus **PE.2.2.2** per semi-präparativer HPLC

Für die präparative Trennung von **PE.2.2.2** (84,3 mg, 100 - 162 mL) per HPLC (HPLC I, **Tabelle 15**, S. 35) wurde aufgrund der hohen Lipophilie der Substanzen eine isokratische Elution mit Acetonitril 98 % (HPLC\_5, **Tabelle 16**, S. 35) gewählt. Im Chromatogramm (**Abbildung 36**) waren zwei basisliniengetrennte Peaks zu erkennen, die den Substanzen **26** und **27** zugeordnet werden konnten.



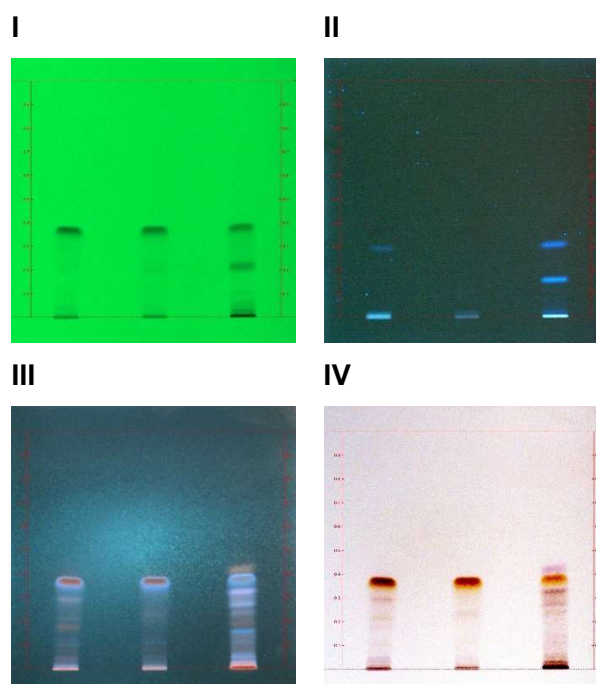
**Abbildung 36** HPLC-Chromatogramm von **PE.2.2.2** bei 290 nm (HPLC\_5)

**Tabelle 33** fasst die Retentionszeiten und die erhaltenen Auswaagen zusammen.

**Tabelle 33** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.2.2.2-1** und **PE.2.2.2-2**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak              |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.2.2.2-1</b> | <b>Substanz 26</b> | 31,5 - 32,1                                      | <b>4,6</b>              |
| <b>PE.2.2.2-2</b> | <b>Substanz 27</b> | 38,8 - 39,7                                      | <b>5,8</b>              |

Nach Derivatisierung erscheinen die beiden Verbindungen auf der DC-Platte (**Abbildung 37**) als intensiv orange gefärbte Signale (**IV**) bzw. zeigen dunkelgraue Fluoreszenz, die hellblau umrandet ist. Auch bei diesen beiden Substanzen ist davon auszugehen, dass es sich um ein korrespondierendes Paar von Acylphloroglucinolen handelt, dessen lipophileres Derivat Substanz **27** ist. Da die Bahnen sehr ähnliche Nebenbanden zeigen, kann vermutet werden, dass diese nicht von Verunreinigungen, sondern von Zersetzungs- oder Umlagerungsprodukten stammen.

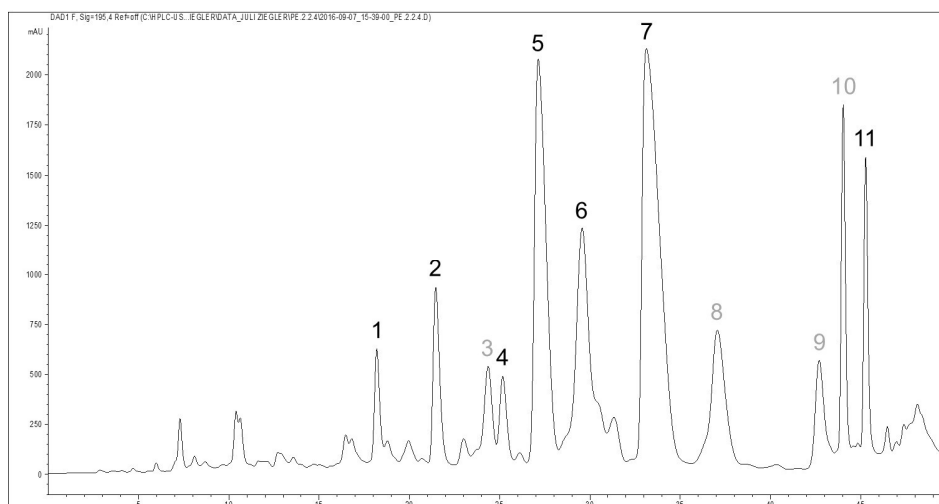


**Abbildung 37** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion **PE.2.2.2** mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.2.2.2-1** (Substanz **26**) und **PE.2.2.2-2** (Substanz **27**) auf den Bahnen 1 und 2 außerdem **PE.2.2.2**-Rest (Bahn 3) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

### 2.2.7.2 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.2.2.4 per semi-präparativer HPLC

Auch die Aufreinigung von **PE.2.2.4** (44,6 mg, 162 - 258 mL) wurde an der semi-präparativen HPLC (HPLC II, **Tabelle 15**, S. 35) durchgeführt. Anwendung der Methode HPLC\_6 (**Tabelle 16**, S. 35) führte zu folgendem Chromatogramm (**Abbildung 38**):



**Abbildung 38** HPLC-Chromatogramm von **PE.2.2.4** bei 195 nm (HPLC\_6)

Von den elf gesammelten Peaks konnten sieben aufgeklärt und beschrieben werden. Auswaagen und Retentionszeiten der erhaltenen Fraktionen sind **Tabelle 34** zu entnehmen.

**Tabelle 34** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.2.2.4-1** bis **PE.2.2.4-11**) an der semi-präparativen HPLC

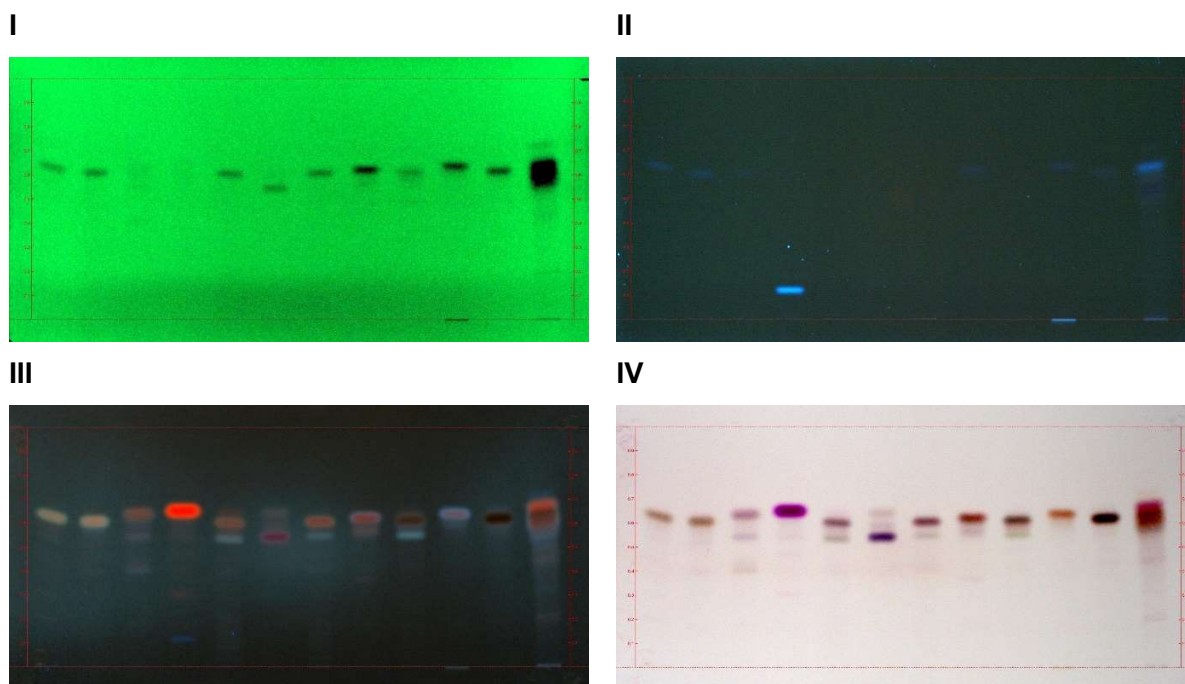
| Peak              |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|-------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.2.2.4-1</b> | <b>Substanz 28</b> | 18,0 - 18,5                                      | <b>1,0</b>              |
| <b>PE.2.2.4-2</b> | <b>Substanz 29</b> | 21,2 - 22,0                                      | <b>1,9</b>              |
| <b>PE.2.2.4-3</b> | -                  | 24,0 - 24,7                                      | <b>1,3</b>              |
| <b>PE.2.2.4-4</b> | <b>Substanz 30</b> | 25,0 - 25,7                                      | <b>1,2</b>              |
| <b>PE.2.2.4-5</b> | <b>Substanz 5</b>  | 26,8 - 28,0                                      | <b>4,5</b>              |
| <b>PE.2.2.4-6</b> | <b>Substanz 14</b> | 29,0 - 30,2                                      | <b>3,4</b>              |
| <b>PE.2.2.4-7</b> | <b>Substanz 6</b>  | 32,7 - 34,5                                      | <b>6,6</b>              |
| <b>PE.2.2.4-8</b> | -                  | 36,5 - 37,8                                      | <b>1,8</b>              |

## ISOLIERUNG

Fortsetzung Tabelle 34

|             |            |             |     |
|-------------|------------|-------------|-----|
| PE.2.2.4-9  | -          | 42,2 - 43,3 | 2,2 |
| PE.2.2.4-10 | -          | 43,9 - 44,4 | 2,0 |
| PE.2.2.4-11 | Substanz 4 | 45,2 - 45,7 | 1,4 |

Das zugehörige Übersichts-DC (**Abbildung 39**) veranschaulicht das Isolierungsergebnis.



**Abbildung 39 Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.2.2.4 mittels semi-präparativer HPLC**

Dargestellt sind die Substanzen **PE.2.2.4-1** (Substanz **28**), **PE.2.2.4-2** (Substanz **29**), **PE.2.2.4-4** (Substanz **30**), **PE.2.2.4-5** (Substanz **5**), **PE.2.2.4-6** (Substanz **14**), **PE.2.2.4-7** (Substanz **6**) und **PE.2.2.4-11** (Substanz **4**) auf den Bahnen 1, 2, 4 bis 7 und 11, außerdem PE.2.2.4-3 (Bahn 3), PE.2.2.4-8 (Bahn 8), PE.2.2.4-9 (Bahn 9), PE.2.2.4-10 (Bahn 10) und PE.2.2.4-Rest (Bahn 12) underivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Auf den Bahnen 1 und 2 sind die Substanzen **28** und **29** als fluoreszenzlöschende (254 nm), hellblau-fluoreszierende (366 nm) und nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz fahl-orange (366 nm) bzw. hellbraune (Vis) Banden zu erkennen. Die Ähnlichkeit deutet bereits ein zusammengehöriges Paar an, wobei Substanz **29** das lipophilere der beiden ist. Obwohl die Isolate auf der DC sehr sauber erscheinen, ergab die Reinheitsbestimmung lediglich Werte von 61,4 und 77,4 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33). Neuartig ist die Zone auf Bahn 4 mit einem

$R_F$ -Wert von 0,68, die nach Derivatisierung grellrot (366 nm) bzw. pink (Vis) erscheint. Da Substanz **30** keine fluoreszenzlöschende Eigenschaft besitzt, wie sie für Acylphloroglucinole in der Regel typisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine andere Substanzklasse handelt. Auch hier führte die Reinheitsbestimmung zu dem interessanten Ergebnis von nur 59,8 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33). Möglicherweise sind die Verunreinigungen der Isolate mit dem gewählten Derivatisierungsreagenz nicht anzufärben und zeigen auch sonst keine Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzlöschung, sodass sie auf der DC-Platte unsichtbar sind. Auch Substanz **5** und **6**, auf den Bahnen 5 und 7, scheinen strukturell eng miteinander verwandt zu sein. Sie weisen einen  $R_F$ -Wert von 0,61 auf, färben sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz rotbraun und besitzen fluoreszenzlöschende, aber keine fluoreszierenden Eigenschaften. Die darunterliegende hellgrüne Bande ( $R_F$  0,55, **IV**) stellt wahrscheinlich ein Abbauprodukt dar. Die Vermutung, dass es zum teilweisen Abbau der Produkte kam, konnte mit der Reinheitsbestimmung bestätigt werden. In beiden HPLC-Chromatogrammen war ein prominenter Nebenpeak zu erkennen, durch den die Substanzen nur zu 54,0 bzw. 63,1 % rein (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) vorlagen (Anhang, **Kapitel 8**). Substanz **14** kann abermals auf der DC-Platte als intensiv lila gefärbter Spot bei  $R_F$  0,55 nach Derivatisierung detektiert werden. Auf Bahn 11 befindet sich mit einem  $R_F$ -Wert von 0,62 Substanz **4**. Vor der Derivatisierung zeigt die Bande Fluoreszenzlöschung und hellblaue Eigenfluoreszenz, die kaum zu erkennen ist. Nach Besprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz erscheint die Zone beinahe schwarz (366 nm) bzw. intensiv rotbraun (Vis). Die Verbindung liegt in einer Reinheit von 78,9 % (HPLC\_2<sub>analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33) vor.

### 2.2.8 Fraktionierung von PE.2.3 mittels CPC

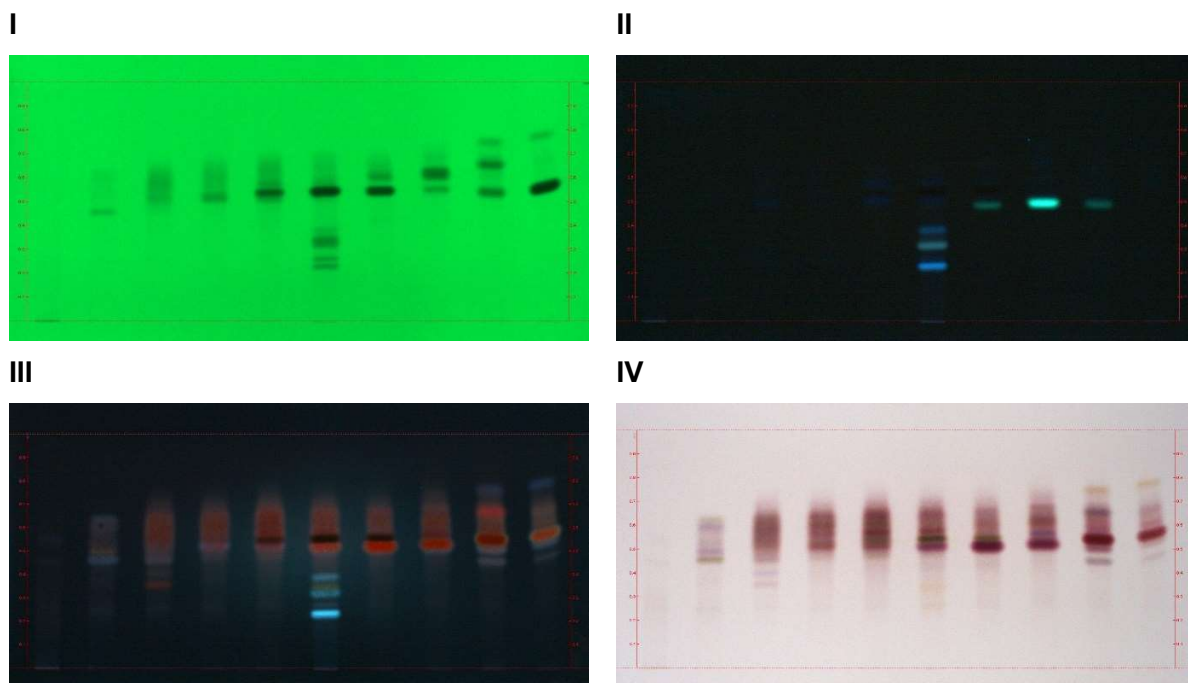
Fraktion **PE.2.3** (764,8 mg, Flash 1 und 2: 420 - 540 mL, 400 - 540 mL) konnte mittels CPC unter Verwendung der Methode CPC\_4 (**Tabelle 12**, S. 31) im absteigenden Modus in zehn Unterfraktionen (**PE.2.3.1** bis **PE.2.3.10**) aufgetrennt werden. Aus **Tabelle 35** geht hervor, dass die Fraktionierung von **PE.2.3** unter den hier gewählten Bedingungen nur mäßig erfolgreich war. Die zweite Fraktion vereint den größten Anteil der Auswaage auf sich und die restlichen Unterfraktionen sind lediglich von sehr geringer Auswaage. Der Wechsel in den aufsteigenden Modus eluierte 49,9 mg, die in einer Fraktion zusammengefasst werden konnten (**PE.2.3.ascending**).

## ISOLIERUNG

**Tabelle 35** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.2.3.1** bis **PE.2.3.10** sowie **PE.2.3.ascending** und **PE.2.3.MeOH**) an der CPC

| Fraktion                | Elutionsbereich [mL] | Auswaage [mg] |
|-------------------------|----------------------|---------------|
|                         | CPC                  | Gesamt        |
| <b>PE.2.3.1</b>         | 0 - 94               | <b>0,8</b>    |
| <b>PE.2.3.2</b>         | 94 - 144             | <b>357,1</b>  |
| <b>PE.2.3.3</b>         | 144 - 206            | <b>35,2</b>   |
| <b>PE.2.3.4</b>         | 206 - 234            | <b>8,3</b>    |
| <b>PE.2.3.5</b>         | 234 - 254            | <b>5,4</b>    |
| <b>PE.2.3.6</b>         | 254 - 286            | <b>12,3</b>   |
| <b>PE.2.3.7</b>         | 286 - 330            | <b>15,8</b>   |
| <b>PE.2.3.8</b>         | 330 - 394            | <b>9,4</b>    |
| <b>PE.2.3.9</b>         | 394 - 626            | <b>23,1</b>   |
| <b>PE.2.3.10</b>        | 626 - 1028           | <b>31,6</b>   |
| <b>PE.2.3.ascending</b> | 0 - 226              | <b>49,9</b>   |
| <b>PE.2.3.MeOH</b>      |                      | <b>4,2</b>    |

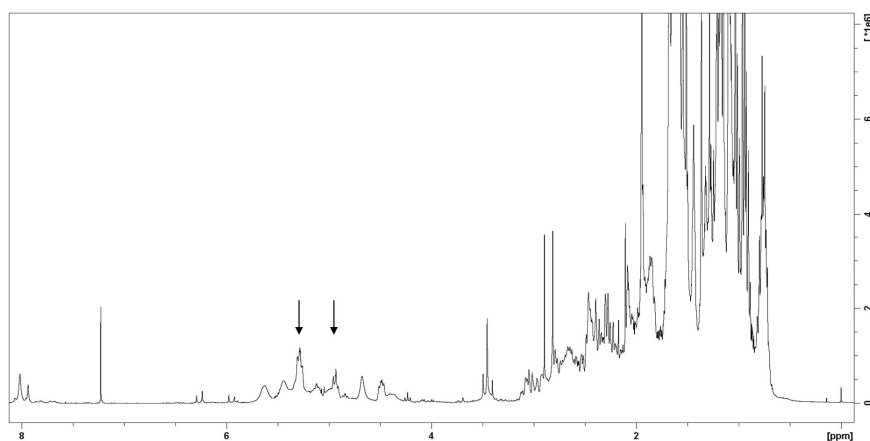
Auf der DC-Platte (**Abbildung 40**) ähneln sich die erhaltenen Fraktionen und zeigen eine Vielzahl an Banden. Auch an der analytischen HPLC konnte dieser Eindruck bestätigt werden. Es konnten bei nur sehr geringer Auswaage zahlreiche Peaks detektiert werden, sodass die Aufreinigung betreffender Unterfraktionen nicht sinnvoll erschien.



**Abbildung 40** Übersichts-DC nach der Fraktionierung von PE.2.3 mittels CPC

Dargestellt sind die Fraktionen **PE.2.3.1** bis **PE.2.3.10** (Bahnen 1 bis 10) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:E-tOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Auch wenn Fraktion **PE.2.3.2** keine ausgeprägten Banden im DC zeigte, so konnten doch im Protonenspektrum eindeutige Signale für Isopreneinheiten gefunden werden (**Abbildung 41**).



**Abbildung 41** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.2.3.2** in CDCl<sub>3</sub>; die Pfeile deuten auf charakteristische Triplets bei  $\delta_H \sim 5$  ppm hin

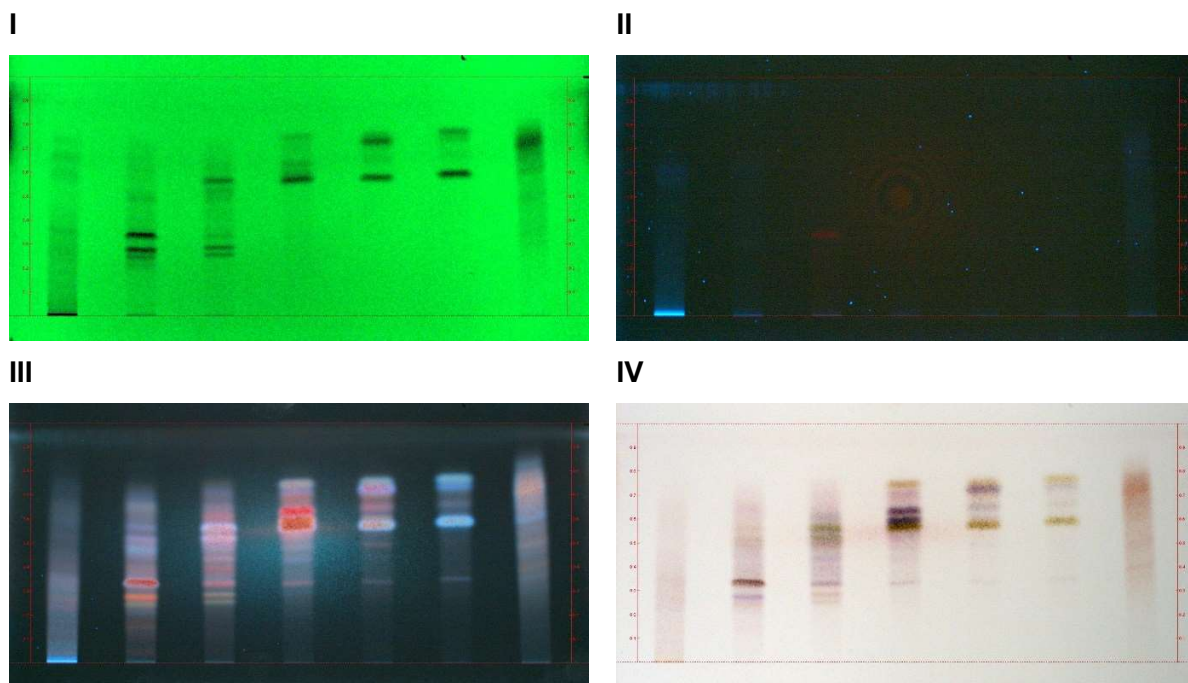


### 2.2.9 Fraktionierung von PE.2.3.2 mittels Flash-Chromatographie

Fraktion **PE.2.3.2** (357,1 mg, 94 - 144 mL) wurde aufgrund der hohen Auswaage vor der Aufreinigung an der semi-präparativen HPLC nochmals mittels Flash-Chromatographie fraktioniert. Zum Einsatz kam dieses Mal eine kleine Kartusche mit RP-18 Material (S2, **Tabelle 9**, S 29). Die Fraktion wurde in vier Aliquoten zu je etwa 90 mg bearbeitet. Ein linearer Gradient von 40 - 100 % Acetonitril führte zur Auftrennung der Fraktion in sieben Unterfraktionen (**PE.2.3.2.1** bis **PE.2.3.2.7**), deren Elutionsbereiche und Auswaagen in **Tabelle 36** aufgeführt sind.

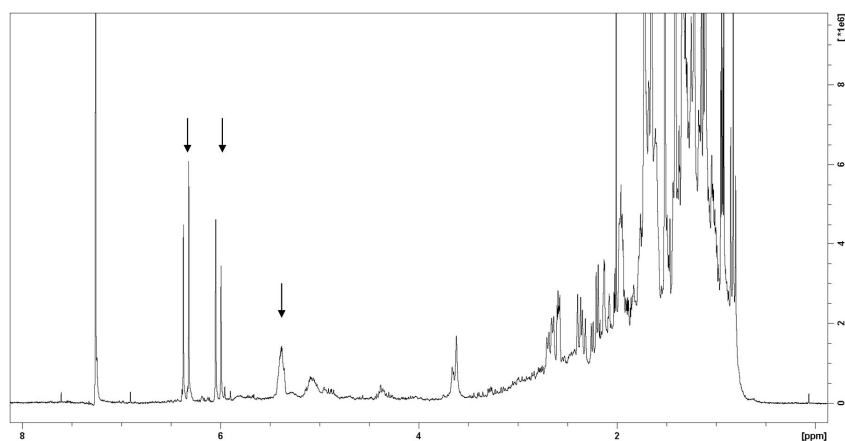
**Tabelle 36** Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen (**PE.2.3.2.1** bis **PE.2.3.2.7**) an Kieselgel-Flash-Chromatographie

| Fraktion          | Elutionsbereich [mL] |           |           |           | Auswaage [mg] |
|-------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|
|                   | Flash 1              | Flash 2   | Flash 3   | Flash 4   | Gesamt        |
| <b>PE.2.3.2.1</b> | 0 - 205              | 0 - 210   | 0 - 210   | 0 - 200   | <b>10,8</b>   |
| <b>PE.2.3.2.2</b> | 205 - 250            | 210 - 260 | 210 - 260 | 200 - 260 | <b>10,3</b>   |
| <b>PE.2.3.2.3</b> | 250 - 280            | 260 - 315 | 260 - 300 | 260 - 300 | <b>14,1</b>   |
| <b>PE.2.3.2.4</b> | 280 - 325            | 315 - 370 | 300 - 355 | 300 - 350 | <b>47,1</b>   |
| <b>PE.2.3.2.5</b> | 325 - 355            | 370 - 410 | 355 - 400 | 350 - 400 | <b>85,6</b>   |
| <b>PE.2.3.2.6</b> | 355 - 395            | 410 - 470 | 400 - 480 | 400 - 460 | <b>57,0</b>   |
| <b>PE.2.3.2.7</b> | 395 - 470            | 470 - 600 | 480 - 600 | 460 - 600 | <b>21,2</b>   |



**Abbildung 42** Übersichts-DC nach der Fraktionierung von PE.2.3.2 an Kieselgel mittels Flash-Chromatographie. Dargestellt sind die Fraktionen PE.2.3.2.1 bis PE.2.3.2.7 (Bahnen 1 bis 7) unterivatisiert bei 254 nm (I) und 366 nm (II) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (III) und bei Tageslicht (IV); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:E-tOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Im Übersichts-DC ist nach Derivatisierung auf Bahn 2 eine dunkelbraune Bande bei  $R_F \sim 0,32$  zu sehen. Und auch die Signale im Protonenspektrum der Fraktion erscheinen interessant.

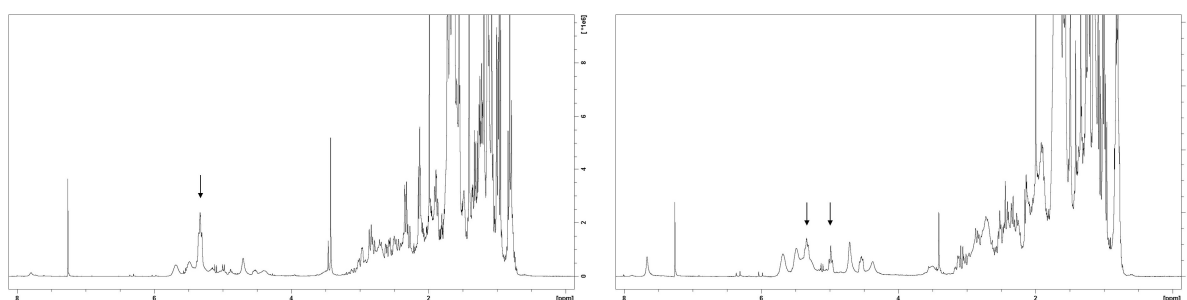


**Abbildung 43**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von PE.2.3.2.2 in  $\text{CDCl}_3$ ; die Pfeile deuten auf die auffälligen Dubletts bei  $\delta_H > 6$  ppm und ein charakteristisches Triplet  $\delta_H > 5$  ppm hin

**PE.2.3.2.3** wies bei geringer Auswaage zahlreiche Banden im Übersichts-DC auf, sodass diese Fraktion für weiterführende Aufreinigungen vernachlässigt wurde. **PE.2.3.2.4** zeigte im Bereich  $R_F$  0,6 bis 0,7 mehrere teils grün-braun, teils lila gefärbte Banden. Die Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC führte nicht zur gewünschten Isolierung von Reinsubstanzen und wird daher nicht weiter thematisiert. Da im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **PE.2.3.2.5** und **PE.2.3.2.6** Hinweise für das Vorhandensein von Isopreneinheiten auszumachen waren (**Abbildung 44**), wurden diese Fraktionen weiterbearbeitet.

#### PE.2.3.2.5

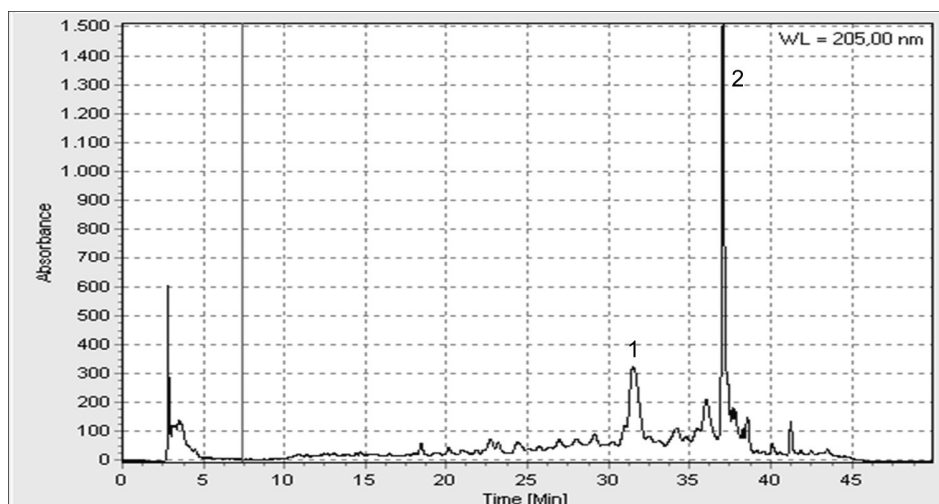
#### PE.2.3.2.6



**Abbildung 44**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300,13 MHz, 295 K) von **PE.2.3.2.5** und **PE.2.3.2.6** in  $\text{CDCl}_3$ ; die Pfeile deuten auf charakteristische Triplets bei  $\delta_{\text{H}} \sim 5$  ppm hin

#### 2.2.9.1 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.2.3.2.2 per semi-präparativer HPLC

Fraktion **PE.2.3.2.2** (10,3 mg, Flash 1 bis 4: 205 - 250 mL, 210 - 260 mL, 210 - 260 mL, 200 - 260 mL) wurde an der semi-präparativen HPLC (HPLC I, **Tabelle 15**, S. 35) mit dem Trennsystem HPLC\_7 (**Tabelle 16**, S. 35) chromatographiert und führte zur Isolierung der bereits bekannten Substanz **16** und einer weiteren Verbindung, die als Substanz **15** beschrieben wird. Die beiden Verbindungen lagen im Chromatogramm neben wenigen kleineren Peaks deutlich getrennt voneinander vor (**Abbildung 45**).



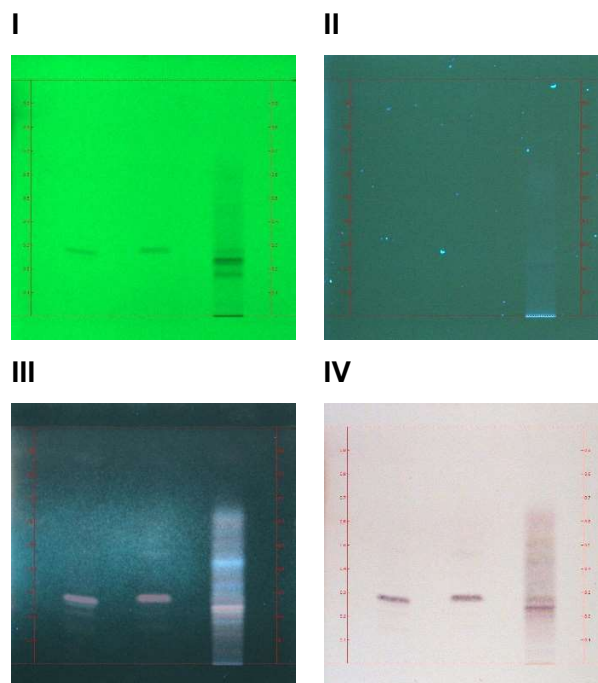
**Abbildung 45** HPLC-Chromatogramm von **PE.2.3.2.2** bei 205 nm (HPLC\_7)

Die Retentionszeiten und Auswaagen von Substanzen **15** und **16** sind in **Tabelle 37** zusammengefasst.

**Tabelle 37** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.2.3.2.2-1** und **PE.2.3.2.2-2**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak                |                    | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|---------------------|--------------------|--|-------------------------|
| <b>PE.2.3.2.2-1</b> | <b>Substanz 15</b> | 30,8 - 31,4                                      | <b>1,0</b>              |
| <b>PE.2.3.2.2-2</b> | <b>Substanz 16</b> | 36,7 - 37,1                                      | <b>1,5</b>              |

Strukturelle Ähnlichkeit der beiden isolierten Verbindungen zeichnete sich bereits auf der DC-Platte ab. So weisen sie einen  $R_F$ -Wert von  $\sim 0,29$  auf, zeigten fluoreszenzlöschende, aber keine fluoreszierende Eigenschaft und stellten sich nach Derivatisierung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz sowohl bei 366 nm als auch bei Tageslicht als lilafarbene Bande dar (**Abbildung 46**). Abermals ergab die Reinheitsbestimmung erstaunlicherweise lediglich einen Wert von 66,7 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33), der anhand des DCs nicht erwartet worden wäre.

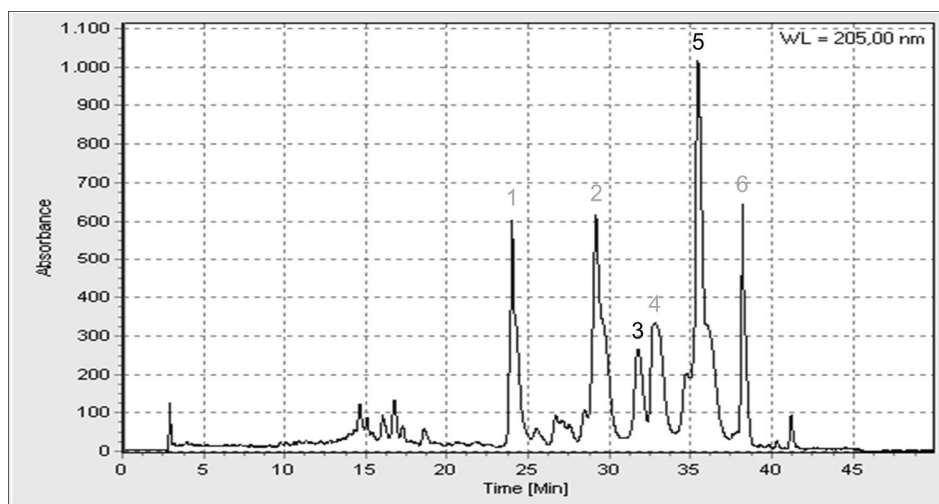


**Abbildung 46** Übersicht-DC der Auftrennung der Fraktion PE.2.3.2.2 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.2.3.2.2-1** (Substanz **15**) und **PE.2.3.2.2-2** (Substanz **16**) auf den Bahnen 1 und 2 sowie **PE.2.3.2.2-Rest** (Bahn 3) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

### 2.2.9.2 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.2.3.2.5 per semi-präparativer HPLC

Aus Fraktion **PE.2.3.2.5** (85,6 mg, Flash1 bis 4: 325 - 355 mL, 370 - 410 mL, 355 - 400 mL, 350 - 400 mL) wurden per semi-präparativer HPLC (HPLC I, **Tabelle 15**, S. 35) sechs Peaks gesammelt, von denen zwei Verbindungen charakterisiert werden konnten. Anwendung fand hierbei Methode HPLC\_8 (**Tabelle 16**, S. 35). **Abbildung 47** zeigt das zugehörige Chromatogramm und verdeutlicht die gesammelten Fraktionen.



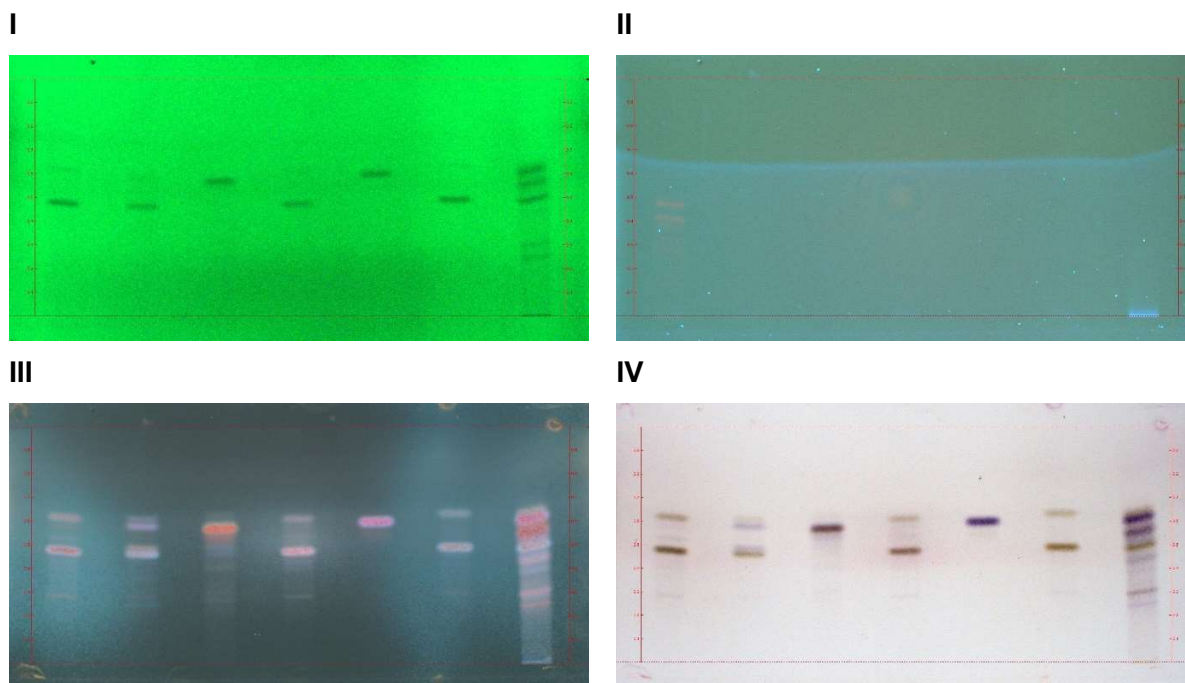
**Abbildung 47** HPLC-Chromatogramm von **PE.2.3.2.5** bei 205 nm (HPLC\_8)

Erhaltene Auswaagen und Retentionsbereiche sind **Tabelle 38** zu entnehmen.

**Tabelle 38** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.2.3.2.5-1** bis **PE.2.3.2.5-5**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak                                   | Retentionsbereich [Min] |  | Auswaage [mg] |
|--|-------------------------|--|---------------|
|  | semi-präparative HPLC   |  | Gesamt        |
| <b>PE.2.3.2.5-1</b>                    | 23,8 - 24,3             |  | <b>6,4</b>    |
| <b>PE.2.3.2.5-2</b>                    | 29,0 - 29,8             |  | <b>11,1</b>   |
| <b>PE.2.3.2.5-3</b> <b>Substanz 7</b>  | 31,5 - 32,2             |  | <b>2,4</b>    |
| <b>PE.2.3.2.5-4</b>                    | 32,6 - 33,1             |  | <b>6,6</b>    |
| <b>PE.2.3.2.5-5</b> <b>Substanz 14</b> | 35,1 - 36,2             |  | <b>15,2</b>   |
| <b>PE.2.3.2.5-6</b>                    | 38,2 - 38,5             |  | <b>4,5</b>    |

Im Übersichts-DC (**Abbildung 48**) waren für **PE.2.3.2.5-3** und **PE.2.3.2.5-5** fluoreszenzlöschende Banden zu erkennen, die nach Derivatisierung bei 366 nm rot bzw. lila erschienen. Der Spot auf Bahn 3 konnte Substanz **7** mit einer Reinheit von 87,2 % (HPLC<sub>2analyt</sub>, **Tabelle 14**, S. 33), der auf Bahn 5, der bereits aus Fraktion **PE.1.3.3** isolierten Substanz **14**, zugeordnet werden. Die anderen vier gesammelten Peaks ergaben auf der DC-Platte abermals zwei Banden, die denen aus Fraktionen **PE.1.3.2** und **PE.1.3.3** sehr ähneln.

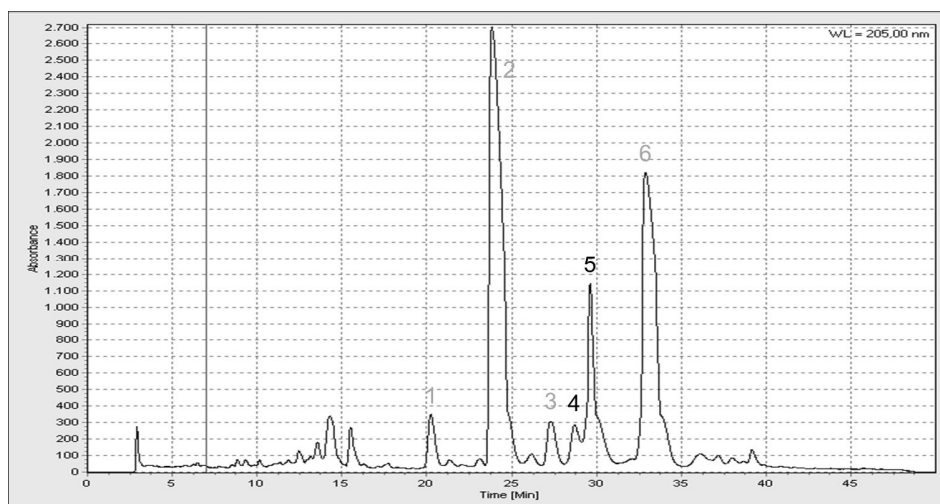


**Abbildung 48** Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.2.3.2.5 mittels semi-präparativer HPLC

Dargestellt sind die Substanzen **PE.2.3.2.5-3** (Substanz **7**) und **PE.2.3.2.5-5** (Substanz **14**) auf den Bahnen 3 und 5, außerdem PE.2.3.2.5-1 (Bahn 1), PE.2.3.2.5-2 (Bahn 2), PE.2.3.2.5-4 (Bahn 4), PE.2.3.2.5-6 (Bahn 6) und PE.2.3.2.5-Rest (Bahn 7) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

### 2.2.9.3 Isolierung von Reinsubstanzen aus PE.2.3.2.6 per semi-präparativer HPLC

Aufreinigung von **PE.2.3.2.6** (57,0 mg, Flash 1 bis 4: 355 - 395 mL, 410 - 470 mL, 400 - 480 mL, 400 - 460 mL) wurde wie die der vorhergehenden Fraktionen an der semi-präparativen HPLC (HPLC I, **Tabelle 15**, S. 35) durchgeführt. **Abbildung 49** zeigt das Chromatogramm, dass bei isokratischer Elution mit Acetonitril 86 % (HPLC\_9, **Tabelle 16**, S. 35) erhalten wurde.



**Abbildung 49** HPLC-Chromatogramm von **PE.2.3.2.6** bei 205 nm (HPLC\_9)

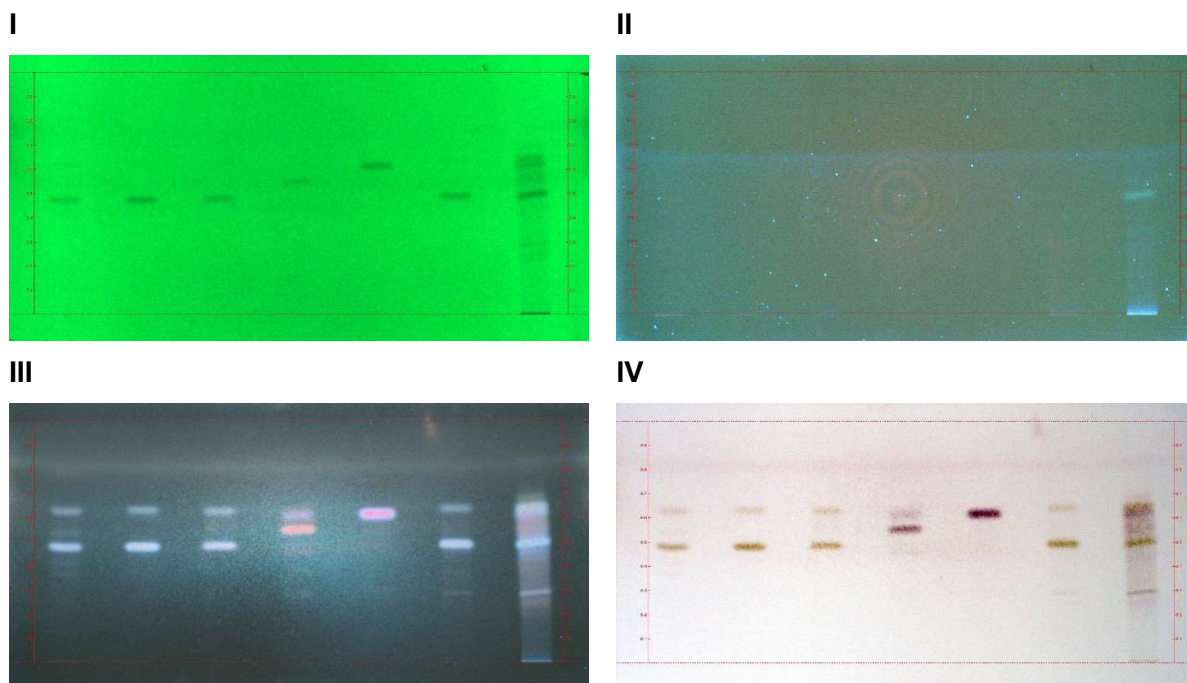
Es wurden sechs Peaks gesammelt, deren Retentionszeiten und Auswaagen in **Tabelle 39** zusammengefasst sind.

**Tabelle 39** Retentionsbereiche und Auswaagen der gesammelten Peaks (**PE.2.3.2.6-1** bis **PE.2.3.2.6-6**) an der semi-präparativen HPLC

| Peak         |             | Retentionsbereich [Min]<br>semi-präparative HPLC | Auswaage [mg]<br>Gesamt |
|--------------|-------------|--|-------------------------|
| PE.2.3.2.6-1 |             | 20,2 - 20,7                                      | 1,4                     |
| PE.2.3.2.6-2 |             | 23,8 - 24,9                                      | 12,6                    |
| PE.2.3.2.6-3 |             | 27,4 - 28,1                                      | 1,3                     |
| PE.2.3.2.6-4 | Substanz 18 | 28,8 - 29,5                                      | 1,5                     |
| PE.2.3.2.6-5 | Substanz 14 | 29,9 - 30,3                                      | 2,4                     |
| PE.2.3.2.6-6 |             | 33,0 - 33,8                                      | 7,7                     |

Anhand des angefertigten Übersicht-DCs (**Abbildung 50**) wird deutlich, dass es sich lediglich bei zwei der gesammelten Peaks um Einzelsubstanzen handelt. Die anderen vier zeichnen sich abermals als grüne Doppelbanden ab (**IV**) und scheinen dieselben wie aus **PE.2.3.2.5** zu sein.





**Abbildung 50 Übersichts-DC der Auftrennung der Fraktion PE.2.3.2.6 mittels semi-präparativer HPLC**

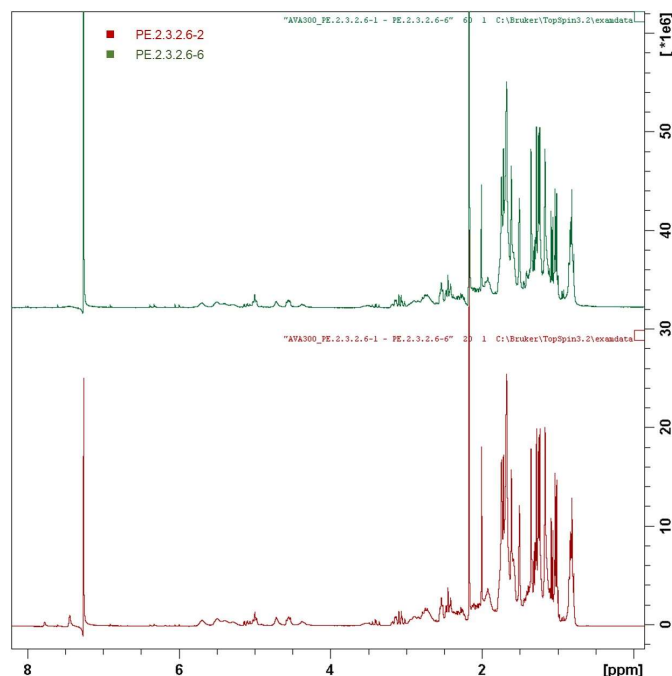
Dargestellt sind die Substanzen **PE.2.3.2.6-4** (Substanz **18**) und **PE.2.3.2.6-5** (Substanz **14**) auf den Bahnen 4 und 5, außerdem PE.2.3.2.6-1 (Bahn 1), PE.2.3.2.6-2 (Bahn 2), PE.2.3.2.6-3 (Bahn 3), PE.2.3.2.6-6 (Bahn 6) und PE.2.3.2.6-Rest (Bahn 7) unterivatisiert bei 254 nm (**I**) und 366 nm (**II**) bzw. nach Derivatisierung mit AAS bei 366 nm (**III**) und bei Tageslicht (**IV**); Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Platten, *n*-Hexan:EtOAc:Ameisensäure (65:33:2 V:V:V)

Die Bande auf Bahn 5 stellt nochmals die bereits bekannte Substanz **14** dar. Die Hauptzone auf Bahn 4 gehört zu Substanz **18**. Darüber kann eine weniger intensive Bande ausgemacht werden, die Substanz **14** entspricht. Diese konnte aufgrund der dicht aufeinander folgenden Elution mit der gewählten Methode nicht vollständig abgetrennt werden. Auf einen weiteren Aufreinigungsschritt wurde aufgrund der geringen Ausbeute verzichtet.

### 2.2.9.3.1 Untersuchung der Doppelbande für PE.2.3.2.6-2 und -6

Nachdem bei der Aufreinigung von Fraktion **PE.2.3.2.6** bereits zum vierten Mal (nach **PE.1.3.2**, **PE.1.3.3** und **PE.2.3.2.5**) vier im Chromatogramm deutlich voneinander getrennte Peaks (**Abbildung 49**, S. 86) als gleichartige Doppelbanden auf dem Dünnschichtchromatogramm erscheinen, sollen die Isolate **PE.2.3.2.6-2** und **PE.2.3.2.6-6** im Folgenden genauer betrachtet werden. Wie bereits bei Fraktion **PE.1.3.2** (**Kapitel 2.2.4.1**, S. 52) erläutert, weisen die beiden Banden auf der Kieselgelplatte einen deutlichen Unterschied von  $\Delta R_F$  0,15 auf, durch den es unwahrscheinlich erscheint, dass es zur simultanen Elution von der RP-18-Säule kommt.

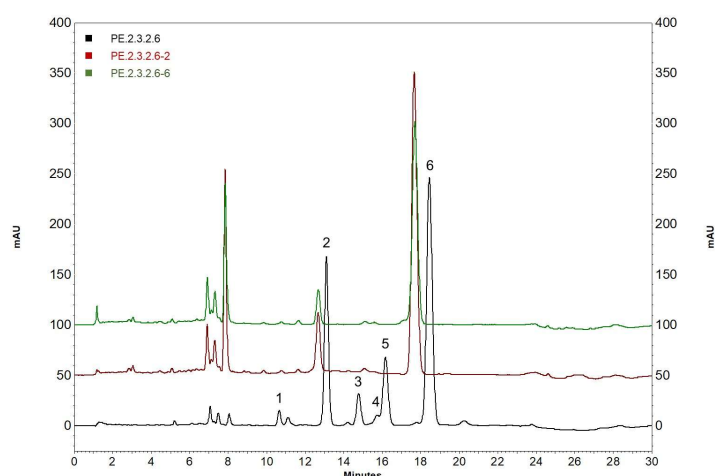
Bei der Betrachtung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der beiden Isolate können keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden (**Abbildung 51**). Lediglich minimale Abweichungen im Verhältnis der Signalintensitäten sind zu erkennen, die allerdings vermutlich auf eine leichte Verbreiterung bzw. Verschmälerung der Signale zurückzuführen sind. Diese Tatsache spricht für das Vorliegen sehr ähnlicher Substanzen z. B. Diastereomeren- oder Tautomerenpaare in den Proben, denn selbst aus kleinen Änderungen der Struktur, beispielsweise einer Konfigurationsänderung an einem der Chiralitätszentren, resultieren Abweichungen in der chemischen Umgebung und damit in der chemischen Verschiebung der Protonen.



**Abbildung 51**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Isolate **PE.2.3.2.6-2** (rot) und **PE.2.3.2.6-6** (grün)

Zusätzlich wurden die Isolate nochmals an der analytischen HPLC chromatographiert. Hierzu fand Methode HPLC\_3<sub>analyt</sub> (**Tabelle 14**, S. 33) Verwendung, die der optimierten Methode für die Fraktionierung von **PE.2.3.2.6** entspricht.

In **Abbildung 52** sind in einem Overlay die erhaltenen Chromatogramme zum einen der Ursprungsfraction **PE.2.3.2.6** (schwarz), zum anderen der beiden isolierten Peaks **PE.2.3.2.6-2** (rot) und **PE.2.3.2.6-6** (grün) dargestellt.



**Abbildung 52** Overlay der HPLC-Chromatogramme von **PE.2.3.2.6** (schwarz), **PE.2.3.2.6-2** (rot) und **PE.2.3.2.6-6** (grün) bei 200 nm (HPLC\_3<sub>analyt</sub>)

Es wird ersichtlich, dass die Isolate identische Läufe ergeben und nicht nur eine Substanz, sondern ein Vielstoffgemisch vorliegt. Im direkten Vergleich erkennt man, dass alle erhaltenen Peaks bereits in der Ursprungsfraction **PE.2.3.2.6** zu finden sind, jedoch in unterschiedlichen Intensitätsverhältnissen. Die beiden zu isolierenden Verbindungen liegen in **PE.2.3.2.6** im Verhältnis 1:2,0 vor, wohingegen die Intensitäten in den Isolaten ein Verhältnis von 1:6,8 (**PE.2.3.2.6-2**) bzw. 1:8,6 (**PE.2.3.2.6-6**) aufweisen (HPLC\_3, **Tabelle 14**, S. 33). Sehr verwunderlich ist in den vermeintlich rein isolierten Fraktionen die Existenz der Komponenten im Retentionsbereich zwischen sieben und acht Minuten, die an der semi-präparativen HPLC eigentlich abgetrennt wurden und nun jedoch verhältnismäßig deutlich enthalten sind.

Der HPLC-Lauf der Isolate führt zu dem Ergebnis, dass sich trotz versuchter Trennung der Verbindungen ein Gleichgewicht zwischen den beiden Substanzen **PE.2.3.2.6-2** und **PE.2.3.2.6-6** einzustellen scheint und sich zusätzlich hydrophilere Substanzen bilden, die früher eluieren.

Die MS-Daten der Fraktionen bekräftigen die Vermutung, dass es sich bei den beiden Hauptverbindungen um Isomere handelt. So ergibt sich sowohl für **PE.2.3.2.6-2**, als auch für **PE.2.3.2.6-6** die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_6$ . Wahrscheinlich erscheinen für die Klasse der Acylphloroglucinole Diastereomere, *cis-trans*-Isomere oder Tautomere. Für alle Peaks mit  $t_R$  7 - 8 Minuten lässt sich aus der Massenspektrometrie die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_8$  ableiten, was sich mit der erhöhten Hydrophilie deckt. Aufgrund der zwei zusätzlichen Sauerstoffatome liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Oxidationsprodukte der beiden Hauptverbindungen handelt.

## 2.3 Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen

Die Aufklärung der Strukturen der isolierten Verbindungen wurde auf Basis der 1D- und 2D-NMR Daten sowie der durch Massenspektrometrie ermittelten Summenformel durchgeführt. Die Reinheit der Isolate wurde per HPLC bestimmt. Charakterisiert wurden die Substanzen mittels UV-Vis-Spektroskopie, Polarimetrie und Circular dichroismus.

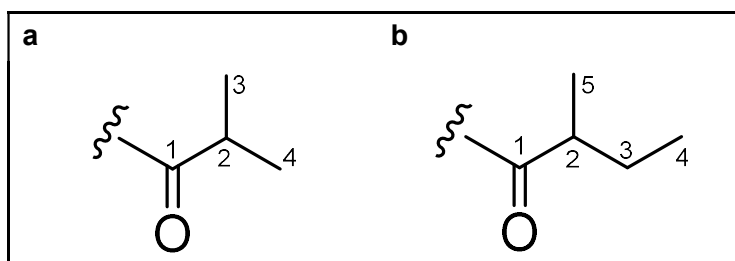
Anhand gemeinsamer Strukturelemente können die 30 isolierten Substanzen in fünf Gruppen unterteilt werden: bicyklische Acylphloroglucinole sowohl vom A-, als auch vom BI-Typ, komplexe Acylphloroglucinole mit einem trizyklischen Grundkörper, der entweder einem Adamantan oder einem Homoadamantan entspricht und drei Verbindungen, die keine Acylphloroglucinole im klassischen Sinne darstellen, sich aber von dieser Substanzklasse ableiten.

### 2.3.1 Allgemeine Strukturelemente

Einige Strukturelemente sind in allen isolierten Verbindungen zu finden und leisten einen wertvollen Beitrag zur schnellen und sicheren Aufklärung der Strukturen.

#### 2.3.1.1 Die Acylseitenkette

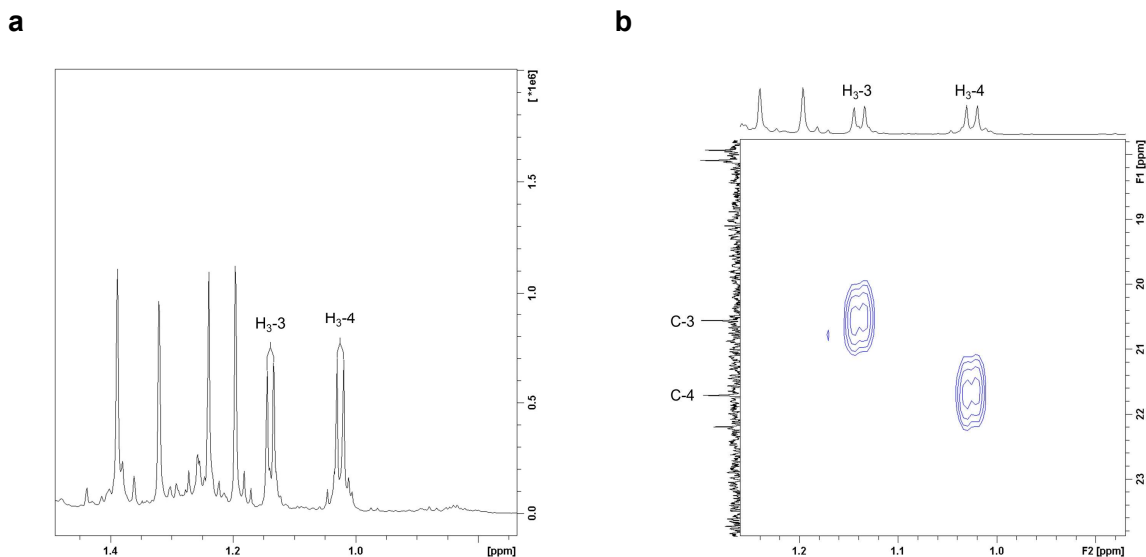
Charakteristisch für die Substanzklasse der Acylphloroglucinole ist eine Acylseitenkette, die aus der Reaktion einer aktivierten Startersäure mit drei Einheiten Malonyl-CoA neben dem Phloroglucin-Grundkörper entsteht. Diese Startersäure kann sowohl aliphatisch, als auch aromatisch sein, wobei aromatische Acylreste weitaus häufiger in der Familie der Clusiaceae als in jener der Hypericaceae zu finden sind (Baggett et al. 1998; Cuesta-Rubio et al. 1998). Die in dieser Arbeit isolierten Substanzen besitzen ausschließlich zwei unterschiedliche aliphatische Reste, das Isobutyryl und das 2-Methylbutyryl (**Abbildung 53**).



**Abbildung 53** Aliphatische Acylseitenketten: Isobutyryl (a) und 2-Methylbutyryl (b)

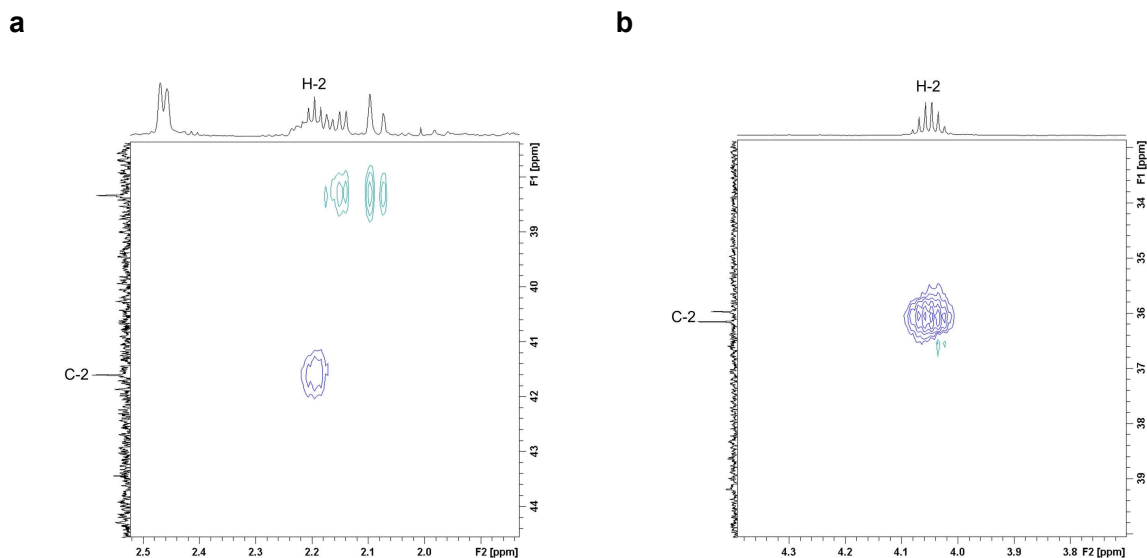
*Isobutyryl-Einheit*

Ein deutlicher Hinweis für eine Isobutyryl-Einheit als Acylrest sind zwei Dubletts  $\delta_{\text{H}} \sim 1,0$  und  $1,1$  ppm im Protonenspektrum für die beiden Methylgruppen  $\text{H}_3\text{-3}$  und  $\text{H}_3\text{-4}$ . Die zugehörigen Kohlenstoffatome liegen im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum bei  $\sim 20$  ppm (**Abbildung 54**).



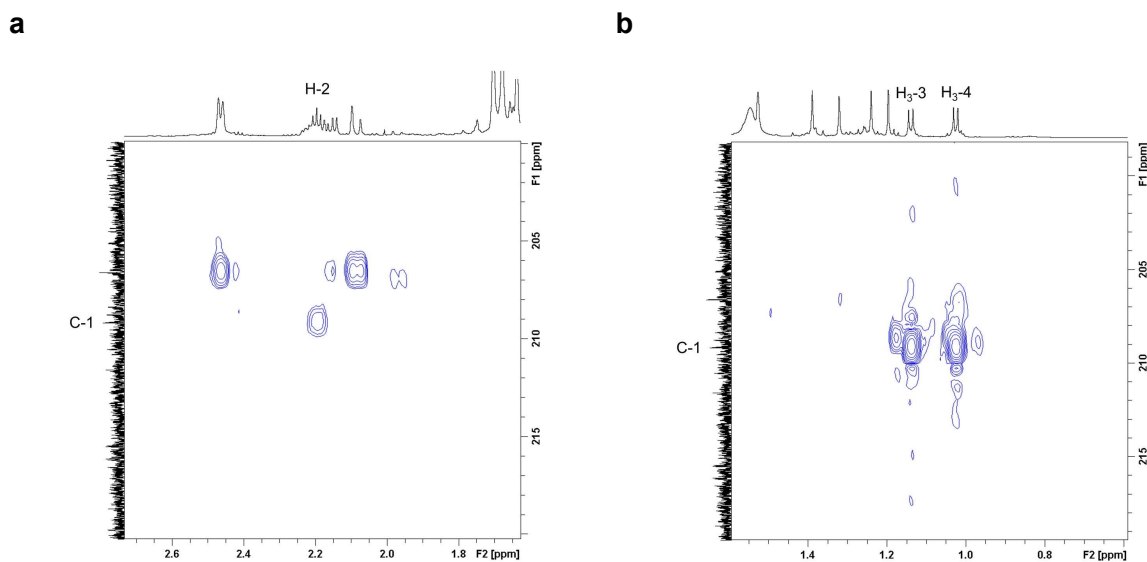
**Abbildung 54** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ - (a) und dem HSQC- Spektrum (b) von **2** mit den Protonen der beiden Methylgruppen  $\text{H}_3\text{-3}$  und  $\text{H}_3\text{-4}$  sowie den Korrelationen zu entsprechenden C-Atomen C-3 und C-4

Entsprechend der Aufspaltungsregel liegt H-2 als Septett vor. Die Lage dieses Protons lässt bereits Rückschlüsse auf die Anwesenheit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Acylrest und dem Phloroglucin-Grundkörper zu. Liegt eine Wasserstoffbrückenbindung vor, so ist das Signal der Methingruppe im Bereich von  $\delta_{\text{H}} \sim 4$  ppm zu finden, ansonsten wird es knapp über 2 ppm detektiert. Auch in Bezug auf die Verschiebung des Kohlenstoffatoms C-2 können Unterschiede ausgemacht werden. Existiert eine intramolekulare Wasserstoffbrücke so wird das C-Atom auf 35 - 40 ppm im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum verschoben, andernfalls ist es knapp über 40 ppm zu finden (**Abbildung 55**).



**Abbildung 55** Ausschnitt aus den HSQC-Spektren von **2** (a) und **26a/b** (b) mit Korrelation des Protons H-2 und zugehörigem Kohlenstoffatom C-2

Das Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion weist eine chemische Verschiebung von  $\delta_C \sim 210$  ppm auf und kann mittels HMBC-Kreuzsignalen zu den umliegenden Protonen H-2, H<sub>3</sub>-3 und H<sub>3</sub>-4 bestimmt werden (**Abbildung 56**).

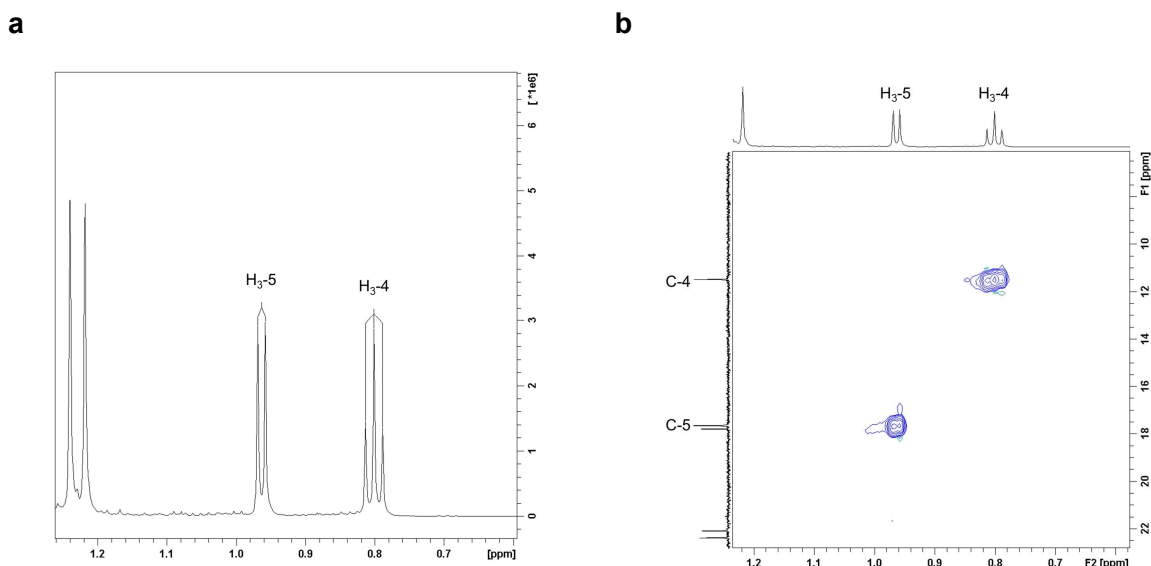


**Abbildung 56** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **2** mit Korrelationen von H-2 zu C-1 (a) und von H<sub>3</sub>-3 und H<sub>3</sub>-4 zu C-1 (b)

Zusätzlich können im HMBC-Spektrum Signale zwischen den Methylprotonen H<sub>3</sub>-3 und H<sub>3</sub>-4 und dem Methinkohlenstoffatom C-2 sowie umgekehrt zwischen dem Methinproton H-2 und den Methylkohlenstoffatomen C-3 und C-4 detektiert werden. Außerdem zeigt das COSY-Spektrum die Protonenkette H<sub>3</sub>-3-H-2-H<sub>3</sub>-4 an.

### 2-Methylbutyryl-Einheit

Auch die 2-Methylbutyryl-Einheit kann meist bereits mit dem Protonenspektrum identifiziert werden. Die Methylgruppe in Position 4 ergibt aufgrund der zwei benachbarten Protonen H<sub>2</sub>-3 im Protonenspektrum ein Triplet bei  $\delta_{\text{H}} \sim 0,8$  ppm. Die zweite Methylgruppe H<sub>3</sub>-5 ist anhand eines Dubletts bei  $\delta_{\text{H}} \sim 1,0$  ppm auszumachen. Die direkt gebundenen Kohlenstoffatome sind mithilfe des HSQC-Spektrums bei  $\delta_{\text{C}} \sim 11$  und 17 ppm zu finden (**Abbildung 57**).

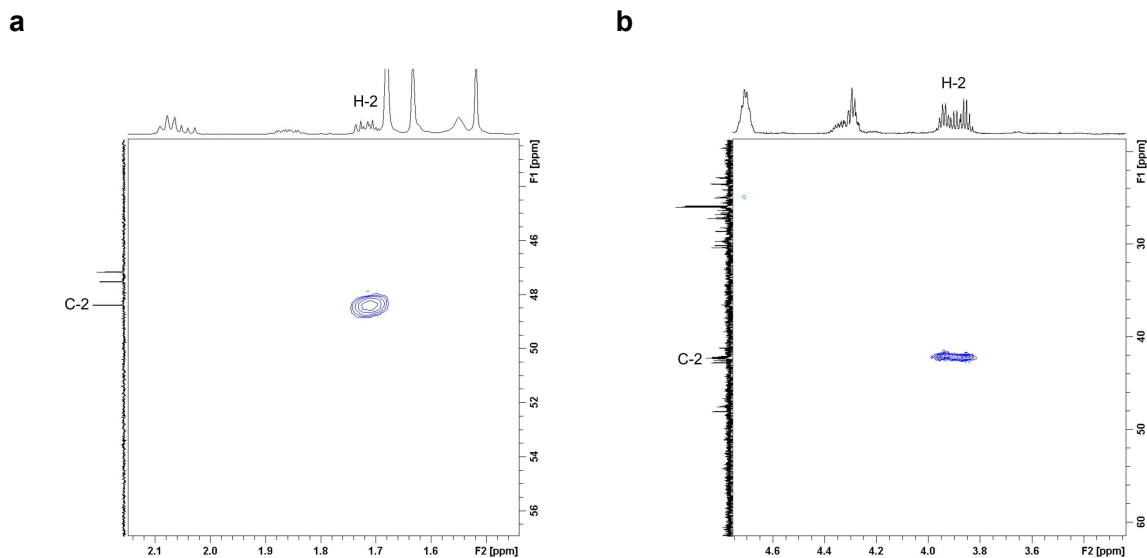


**Abbildung 57** Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H- (a) und dem HSQC-Spektrum (b) von **1** mit den Protonen der beiden Methylgruppen H<sub>3</sub>-4 und H<sub>3</sub>-5 und den Korrelationen zu entsprechenden C-Atomen C-4 und C-5

Das Wasserstoffatom der Methingruppe in Position 2 weist eine weniger ausgeprägte Verschiebung als in der Isobutyryl-Einheit auf, da die längere Alkylkette einen größeren +I-Effekt besitzt und damit das H-Atom besser abschirmt ( $\delta_{\text{H}} \sim 1,7$  ppm). Auch hier ist bei vorhandener intramolekularen Wasserstoffbrücke durch die stärkere Entschirmung das H-Atom weiter ins Tieffeld verschoben ( $\delta_{\text{H}} \sim 4$  ppm). Das Kohlenstoffatom liegt in einem Fall bei einer chemischen Verschie-



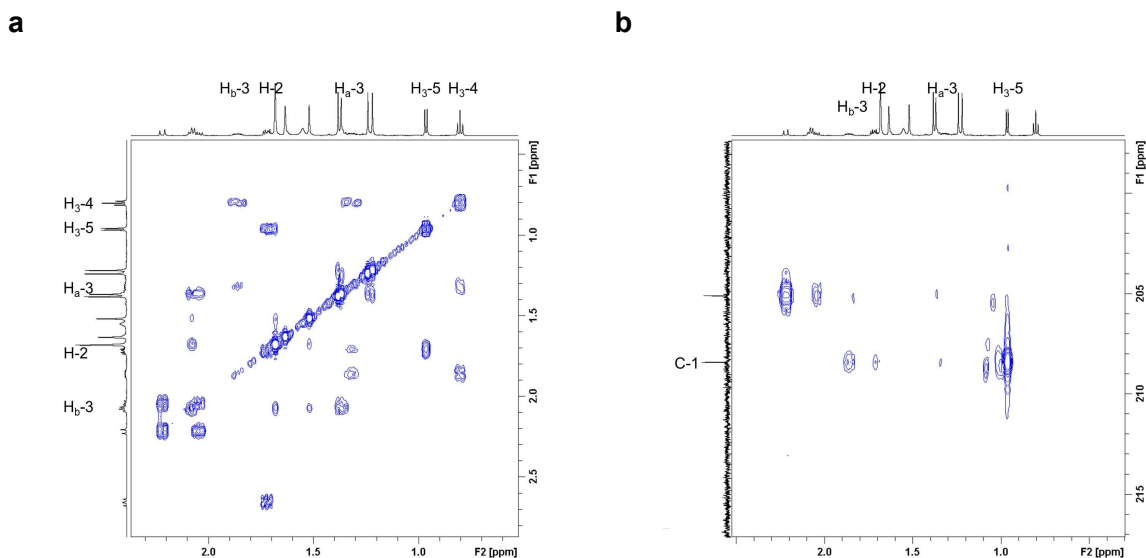
bung von über  $\delta_c$  45 ppm, im anderen bei  $\delta_c$  40 - 45 ppm (**Abbildung 58**). Das Aufspaltungsmuster als Dublett vom Dublett vom Dublett ist häufig nicht eindeutig nachweisbar oder es erscheint als Pseudo-Sextett.



**Abbildung 58** Ausschnitt aus den HSQC-Spektren von **1** (a) und **27** (b) mit Korrelation des Protons H-2 und zugehörigem Kohlenstoffatom C-2

Durch Kreuzsignale im COSY-Spektrum kann die Protonenkette  $H_3-5-H_2-H_2-3-H_3-4$  ermittelt und damit die Protonen der Methylengruppe  $H_2-3$  bestimmt werden (**Abbildung 59, a**).

Untermauert wird die Struktur des Acylrests durch zahlreiche HMBC-Korrelationen. Es werden Kreuzsignale zwischen H-2 und C-1, C-3 C-4 und C-5, zwischen  $H_2-3$  und C-1, C-2, C-4 und C-5, zwischen  $H_3-4$  und C-2 und C-3 und letztlich auch zwischen  $H_3-5$  und C-1, C-2 und C-3 (**Abbildung 59, b**) gefunden.

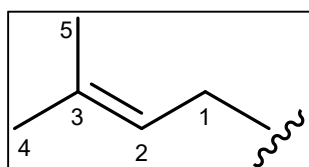


**Abbildung 59** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **1** mit Kreuzsignalen zwischen den Protonen der Kette H<sub>3</sub>-4-H-2-H<sub>a/b</sub>-3-H<sub>3</sub>-5 (a) und Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen von H-2, H<sub>a/b</sub>-3 und H<sub>3</sub>-5 zu C-1 (b)

Die Konfiguration des Stereozentrums C-2 ist aufgrund der freien Drehbarkeit nur sehr schwer zu bestimmen und wird mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht festgelegt.

Die Verknüpfungsstelle des Acylrests an den Phloroglucinring kann anhand der HMBC-Daten nicht zweifelsfrei zugeordnet werden, da keine Signale zwischen dem Ring und dem Acylrest gefunden werden. Allerdings deuten die Tieffeldverschiebung des quartären C-Atoms an Position 1 mit  $\delta_C$  70 - 80 ppm sowie grundsätzliche biosynthetische Aspekte stark darauf hin, dass das Kohlenstoffatom von drei Carbonylfunktionen eingerahmt wird.

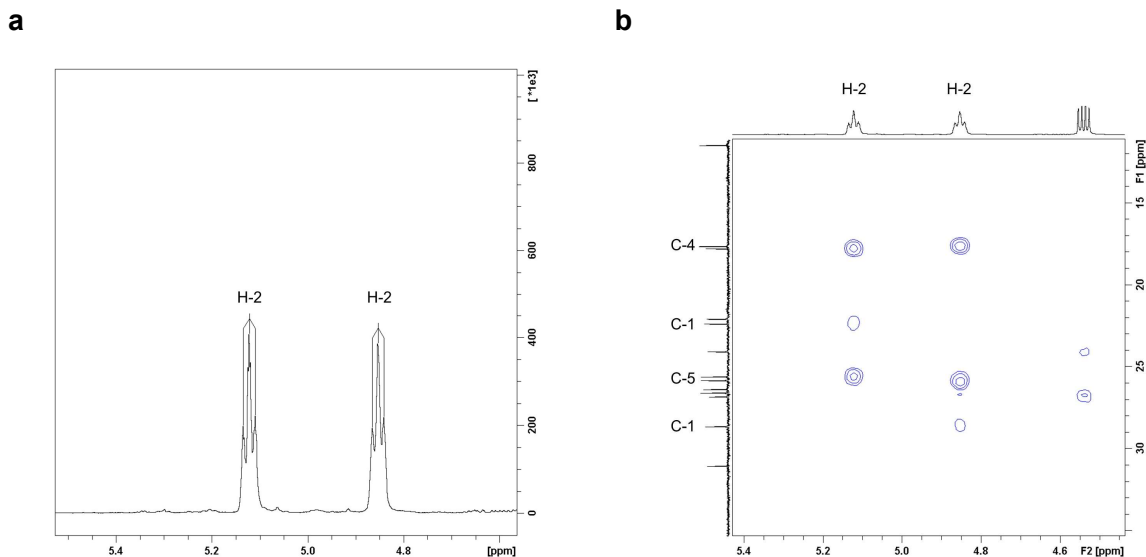
### 2.3.1.2 Die Prenylsubstituenten



**Abbildung 1** Prenylrest

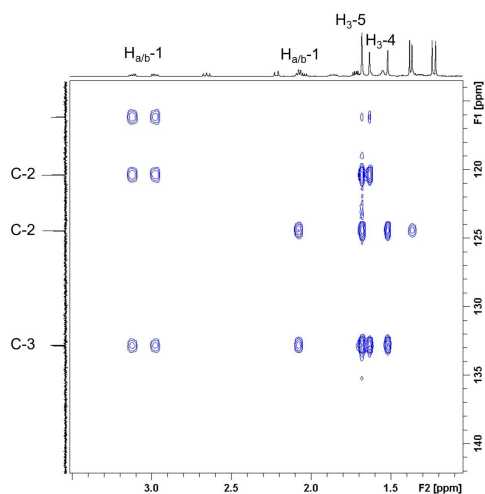
Die Großzahl der Acylphloroglucinole liegt prenyliert vor, d.h. der Grundkörper ist mit Prenyleinheiten substituiert (**Abbildung 60**). Bereits im Protonenspektrum werden diese Prenylreste durch ein eindeutiges Triplett  $\delta_H$  ~5 ppm angezeigt, das für das Proton an C-2 steht (**Abbildung 61, a**). Ausgehend vom olefinischen Proton H-2 sind im

HMBC-Spektrum Kreuzsignale zu den Methylkohlenstoffatomen C-4 und C-5 sowie weniger intensiv zum Methylen-C-Atom C-1 zu erkennen (**Abbildung 61, b**). Charakteristisch ist, dass eines der beiden Kohlenstoffatome der Methylgruppen C-4 und C-5 im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ein Signal bei  $\delta_{\text{C}}$   $\sim 18$  ppm, das andere bei  $\delta_{\text{C}}$   $\sim 26$  ppm ergibt.



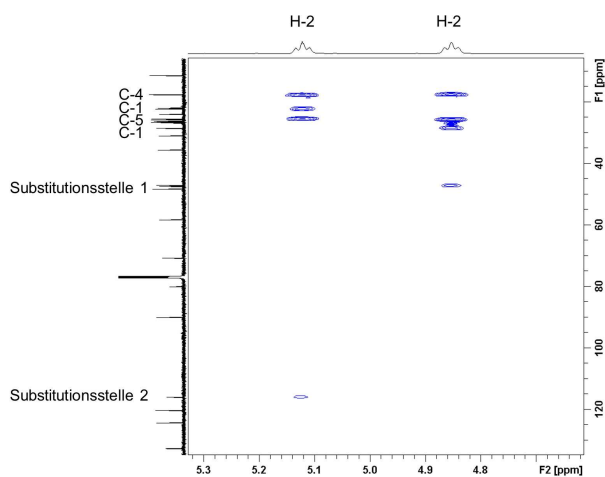
**Abbildung 61** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ - (a) und HMBC-Spektrum (b) von **1** mit den charakteristischen Triplets zweier olefinischer Protonen H-2 und den Kreuzsignalen zu den Kohlenstoffatomen der Methylgruppen C-4 und C-5 sowie der Methylengruppe C-1

HMBC-Korrelationen der Methylen- und Methylprotonen H<sub>2</sub>-1, H<sub>3</sub>-4 und H<sub>3</sub>-5 mit den C-Atomen C-2 und C-3 offenbaren die chemischen Verschiebungen der olefinischen Kohlenstoffatome.



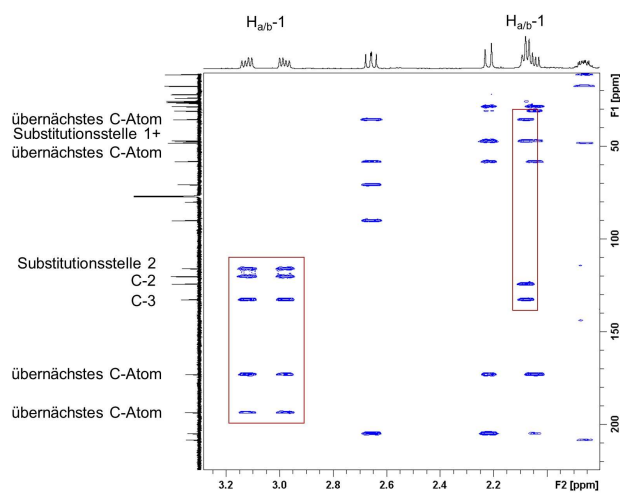
**Abbildung 62** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Kreuzsignalen zwischen den Protonen H<sub>a/b</sub>-1, H<sub>3</sub>-4 und H<sub>3</sub>-5

Das HMBC-Spektrum liefert außerdem wichtige Informationen zu den Substitutionsstellen der Prenylreste. So können meist sehr schwache Kreuzsignale von dem olefinischen Proton detektiert werden (**Abbildung 63**).



**Abbildung 63** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen der olefinischen Protonen H-2 zu den Kohlenstoffatomen C-1, C-4, C-5 und den Substitutionsstellen der Isopreneinheiten

Verifiziert werden die Substitutionsstellen mithilfe der Korrelationen zu den Methylprotonen H<sub>2</sub>-1, welche zusätzlich die übernächsten Kohlenstoffatome anzeigen.



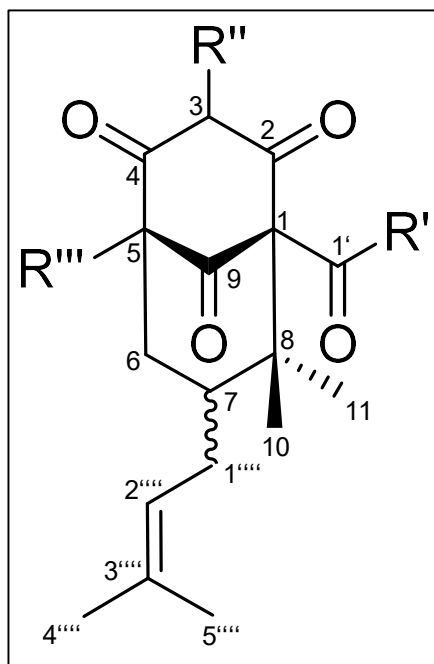
**Abbildung 64** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen der Methylenprotonen  $H_{a/b-1}$  zu den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3, den Substitutionsstellen und den übernächsten C-Atomen

### 2.3.2 Acylphloroglucinole vom Typ-A (Hyperforin-Typ)

Die vier isolierten Substanzen **1** bis **4** gehören wie der wohl bekannteste Vertreter der Acylphloroglucinole, das Hyperforin, zu den polyzyklischen, polyprenylierten Acylphloroglucinolen (PPAP) vom A-Typ. Bei den verschiedenen Typen kommt es zur Substitution des Phloroglucin-Grundkörpers mit einer Isopren- bzw. Geranyleinheit und anschließendem Ringschluss über eine C-C-Bindung. In diesem Fall ist der Ring an C-5 prenyliert und über C-3 der Isopreneinheit mit C-1 verknüpft.

#### 2.3.2.1 Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts

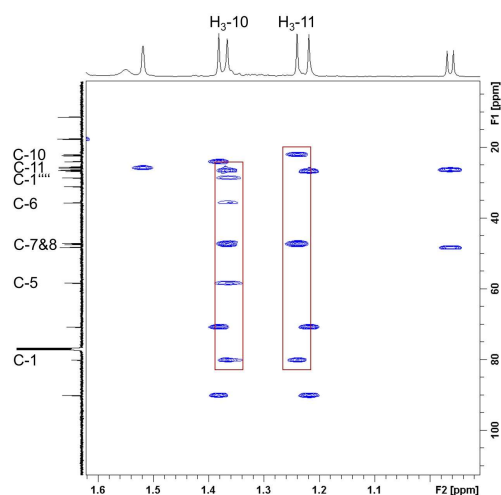
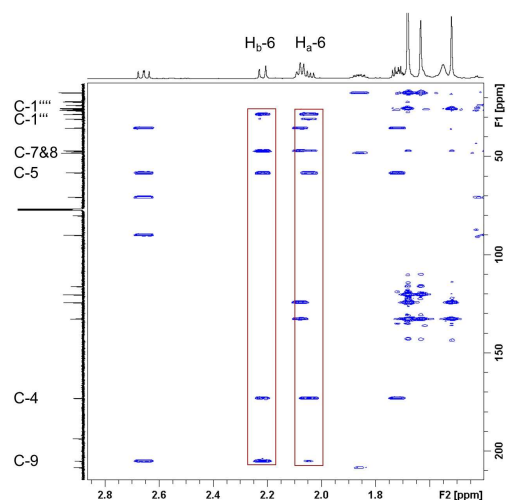
Der aliphatische Acylrest ist in Position 1 zu finden und alle isolierten Substanzen vom A-Typ weisen eine Isoprenuntereinheit an C-7 auf, woraus sich folgendes Skelett für die Substanzen **1** bis **4** ergibt:



**Abbildung 65** Grundkörper der Substanzen **1** bis **4**: Acylphloroglucinole vom A-Typ (Hyperforin-Typ)

Der Phloroglucinring weist nur quartäre Kohlenstoffatome auf, sodass von hier aus keine Kreuzsignale detektiert werden konnten. Allerdings konnten die Kopplung zahlreicher Protonen zu den

betreffenden C-Atomen im HMBC-Spektrum identifiziert werden, wodurch das Grundgerüst ermittelt werden konnte. Die Protonen der geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-10 und H<sub>3</sub>-11 zeigten im HMBC-Spektrum Korrelationen zu C-1, C-7, C-8 und zum jeweils anderen C-Atom, C-10 oder C-11. Bei großen Ausbeuten konnten ausgehend von der  $\beta$ -gerichteten Methylgruppe H<sub>3</sub>-10 zum Teil schwache Kreuzsignale zu den Methylenkohlenstoffatomen C-6 und C-1''' sowie zum quartären C-Atom C-5 detektiert werden (**Abbildung 66, a**).

**a****b**

**Abbildung 66** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen der geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-10 und H<sub>3</sub>-11 und den C-Atomen C-1, C-7, C-8 und C-10 oder C-11, hier für H<sub>3</sub>-10 auch mit C-5, C-6 und C-1''' (**a**) und der Methylengruppe H<sub>a/b</sub>-6 und C-4, C-5, C-7, C-8, C-9, C-1'' und C-1''' (**b**)

Ausgehend von den Methylenprotonen an C-6 konnten die Kohlenstoffatome C-4, C-5, C-7, C-8, C-9 und die beiden Methylen-Kohlenstoffatome der Isoprenreste C-1'' und C-1''' identifiziert werden (**Abbildung 66, b**). Die bereits in **Kapitel 2.3.1** vorgestellten HMBC-Korrelationen zur Ermittlung der Acyl- und Isopreneinheiten und deren Substitutionsstellen wurden ebenfalls gefunden und erlaubten so die Zuordnung der Kohlenstoffatome.

Das starre, bizyklische Grundgerüst der Acylphloroglucinole vom A-Typ legt die relative Konfiguration der beiden Stereozentren C-1 und C-5 fest, alle weiteren wurden durch Auswertung der NOESY-Daten und mithilfe von Literaturdaten ermittelt.

## 2.3.2.2 Substanzen 1, 2 und 3

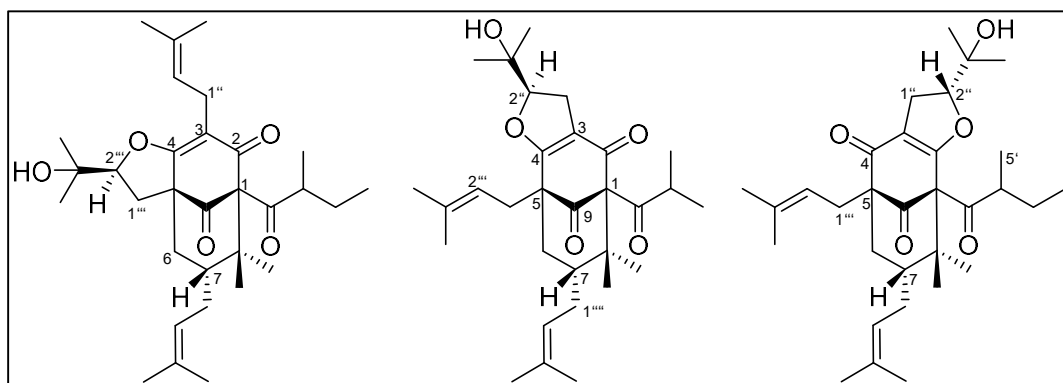


Abbildung 67 Strukturformeln der isolierten Substanzen 1, 2 und 3

Tabelle 40  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 1, 2 und 3; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                                     | Substanz 1 |                     |  | Substanz 2          |   |  | Substanz 3          |   |  |
|-------------------------------------|------------|---------------------|--|---------------------|---|--|---------------------|---|--|
|                                     | C/H        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                                  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                       |  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                       |  |
| Typ A-Acyphloroglucinol-Grundgerüst | 1          | 80,1                |  | 80,9                |   |  | 72,1                |   |  |
|                                     | 2          | 193,6               |  | 188,8               |   |  | 172,7               |   |  |
|                                     | 3          | 116,1               |  | 118,8               |   |  | 119,3               |   |  |
|                                     | 4          | 173,2               |  | 177,9               |   |  | 191,5               |   |  |
|                                     | 5          | 58,4                |  | 52,9                |   |  | 62,2                |   |  |
|                                     | 6          | 35,7                | a 2,05 (1H, dd, 7,5, -14,3)<br>b 2,22 (1H, d, -14,2)                   | 38,3                | a 2,08 (1H, d, -14,3)<br>b 2,15 (1H, dd, 6,6, -14,1)        |  | 39,0                | 2,00 (2H, m)  |  |
|                                     | 7          | 47,1                | 1,36 (1H, m)   | 48,1                | 1,40 (1H, m)  |  | 48,1                | 1,37 (1H, m)  |  |
|                                     | 8          | 47,5                |  | 47,3                |   |  | 46,7                |   |  |
|                                     | 9          | 205,1               |  | 206,6               |   |  | 206,9               |   |  |
|                                     | 10         | 22,1                | 1,37 (3H, s)   | 22,2                | 1,32 (3H, s)  |  | 23,7                | 1,39 (3H, s)  |  |
|                                     | 11         | 26,6                | 1,24 (3H, s)   | 26,4                | 1,20 (3H, s)  |  | 26,3                | 1,25 (3H, s)  |  |
| Acyl-Seitenkette                    | 1'         | 208,4               |  | 209,1               |   |  | 208,2               |   |  |
|                                     | 2'         | 48,4                | 1,71 (1H, m)   | 41,6                | 2,20 (1H, sept, 6,4)  |  | 46,8                | 2,10 (1H, m)  |  |
|                                     | 3'         | 26,4                | a 1,32 (1H, ddd, 2,6, 7,1, -13,7)<br>b 1,86 (1H, ddd, 2,8, 7,6, -13,4) | 20,5                | 1,14 (3H, d, 6,4)   |  | 37,0                | 1,98 (2H, m)  |  |
|                                     | 4'         | 11,5                | 0,80 (3H, t, 7,4)  | 21,7                | 1,03 (3H, d, 6,5)   |  | 11,6                | 0,85 (3H, t, 7,4)   |  |
|                                     | 5'         | 17,6                | 0,96 (3H, d, 6,5)  |                     |   |  | 16,9                | 1,03 (3H, d, 6,7)   |  |
| Isopren I                           | 1''        | 22,4                | a 2,98 (1H, dd, 7,4, -14,3)<br>b 3,12 (1H, dd, 7,5, -14,3)             | 28,0                | a 2,79 (1H, dd, 11,5, -14,7)<br>b 2,88 (1H, dd, 9,5, -14,6) |  | 27,7                | a 2,85 (1H, dd, 11,7, -14,8)<br>b 2,93 (1H, dd, 9,8, -14,9) |  |
|                                     | 2''        | 120,3               | 5,12 (1H, t, 7,4)  | 93,4                | 4,62 (1H, dd, 9,6, 11,3)                                    |  | 93,4                | 4,62 (1H, dd, 9,8, 11,5)                                    |  |
|                                     | 3''        | 132,8               |  | 70,7                |   |  | 70,7                |   |  |
|                                     | 4''        | 17,8                | 1,68 (3H, s)   | 24,9                | 1,24 (3H, s)  |  | 25,1                | 1,28 (3H, s)  |  |
|                                     | 5''        | 25,6                | 1,63 (3H, s)   | 26,8                | 1,39 (3H, s)  |  | 26,6                | 1,36 (3H, s)  |  |
| Isopren II                          | 1'''       | 31,0                | a 1,72 (1H, m)<br>b 2,66 (1H, dd, 11,0, -12,9)                         | 29,8                | 2,46 (2H, d, 7,3)   |  | 29,8                | a 2,42 (1H, dd, 7,3, -14,2)<br>b 2,49 (1H, dd, 7,2, -15,0)  |  |
|                                     | 2'''       | 90,1                | 4,54 (1H, dd, 5,4, 10,9)   | 118,2               | 5,12 (1H, t, 7,2)   |  | 119,5               | 4,98 (1H, t, 6,2)   |  |
|                                     | 3'''       | 70,8                |  | 134,9               |   |  | 134,3               |   |  |
|                                     | 4'''       | 24,0                | 1,22 (3H, s)   | 18,1                | 1,68 (3H, s)  |  | 18,1                | 1,69 (3H, s)  |  |
|                                     | 5'''       | 26,8                | 1,38 (3H, s)   | 26,1                | 1,70 (3H, s)  |  | 26,0                | 1,64 (H, s)   |  |



Fortsetzung Tabelle 40

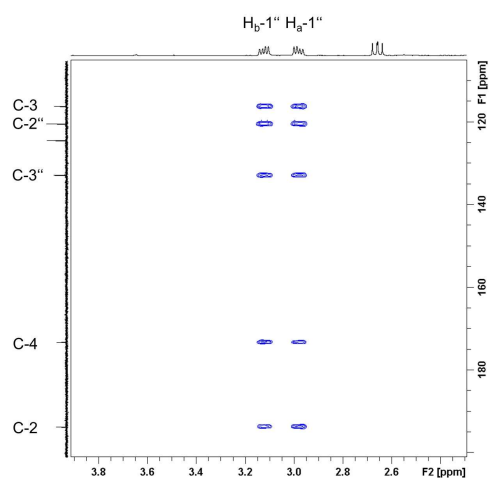
|             |                  |       |                   |       |                                  |       |                                  |
|-------------|------------------|-------|-------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|
| Isopren III | 1 <sup>'''</sup> | 28,6  | 2,08 (2H, t, 7,9) | 29,9  | a 1,67 (1H, m)<br>b 2,22 (1H, m) | 29,3  | a 1,79 (1H, m)<br>b 2,17 (1H, m) |
|             | 2 <sup>'''</sup> | 124,4 | 4,85 (1H, t, 7,3) | 124,7 | 4,99 (1H, t, 6,8)                | 124,4 | 4,83 (1H, t, 7,0)                |
|             | 3 <sup>'''</sup> | 132,8 |                   | 132,3 |                                  | 132,9 |                                  |
|             | 4 <sup>'''</sup> | 17,6  | 1,52 (3H, s)      | 17,9  | 1,53 (3H, s)                     | 17,9  | 1,52 (3H, s)                     |
|             | 5 <sup>'''</sup> | 25,8  | 1,68 (3H, s)      | 25,7  | 1,64 (3H, s)                     | 25,8  | 1,64 (3H, s)                     |

*Substanz 1*

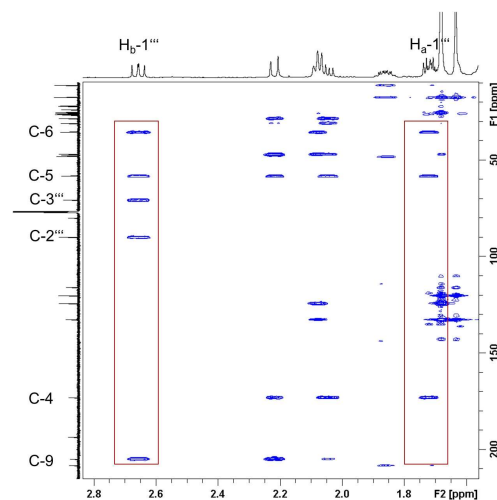
Ein pseudomolekulares Ion bei  $m/z$  499,3425  $[M+H]^+$  (berechnet 499,3418) im ESI-HRMS führte zur Summenformel  $C_{31}H_{46}O_5$  für Substanz **1**. Anhand der HSQC-Daten konnten elf quartäre C-Atome, fünf Methin-, fünf Methylen- und zehn Methylgruppen identifiziert werden.

An C-1 des Phloroglucin-Grundkörpers ( $\delta_C$  80,1 ppm) ist ein aliphatischer Acylrest verknüpft. Im  $^1H$ -Spektrum wurden Signale für das charakteristische Triplett ( $\delta_H$  0,80 ppm) und Dublett ( $\delta_H$  0,96 ppm) sowie alle zugehörigen HMBC-Signale (C-1' bis C-5') einer 2-Methylbutyrylgruppe gefunden. Auch konnte die Isopreneinheit an C-7 ( $\delta_C$  47,1 ppm) mit allen entsprechenden Korrelationen ermittelt werden. Zusätzlich war im  $^1H$ -Spektrum ein weiteres Triplett bei  $\delta_H$  5,12 ppm auszumachen, das HMBC-Korrelationen zur Methylengruppe C-1'' ( $\delta_C$  22,4 ppm) zeigt. Ausgehend von den Protonen dieser Methylengruppe ( $\delta_H$  2,98 und 3,12 ppm) konnten Korrelationen zu C-2 ( $\delta_C$  193,6 ppm), C-3 ( $\delta_C$  116,1 ppm) und C-4 ( $\delta_H$  173,2 ppm) gefunden werden, welche die Verknüpfungen einer Dimethylallyl-Seitenkette an C-3 bestätigen (**Abbildung 68, a**).

a

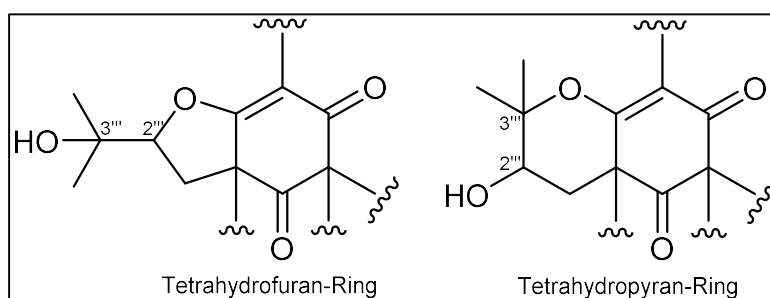


b



**Abbildung 68** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **1** mit Korrelationen der Methylenprotonen  $H_{a/b-1''}$  zu C-2, C-3, C-4, C-2'' und C-3'' (a) sowie der Protonen  $H_{a/b-1'''}$  zu C-4, C-5, C-6, C-9, C-2''' und C-3''' (b)

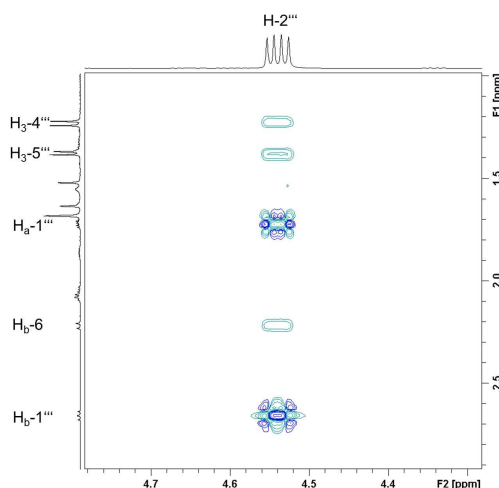
Die Verschiebungen der quartären C-Atome C-2, C-3 und C-4 weisen auf eine enolisierte Diketo-Funktion hin. Die Protonen der Methylengruppe C-1''' ( $\delta_H$  1,72 und 2,66 ppm) ergeben Kreuzsignale mit drei Kohlenstoffatomen im Phloroglucinring (C-4, C-5  $\delta_C$  58,4 ppm und C-9  $\delta_C$  205,1 ppm) sowie zu den beiden quartären C-Atomen C-2''' ( $\delta_C$  90,1 ppm) und C-3''' ( $\delta_C$  70,8 ppm) (**Abbildung 68, b**). Die tieffeldverschobenen Positionen von C-2''' und C-3''' deuten auf eine Verknüpfung mit einem Sauerstoffatom hin. In Anbetracht der ermittelten Summenformel sind zwei Strukturen möglich:



**Abbildung 69** Optionen für die Ringbildung in der Struktur von **1**

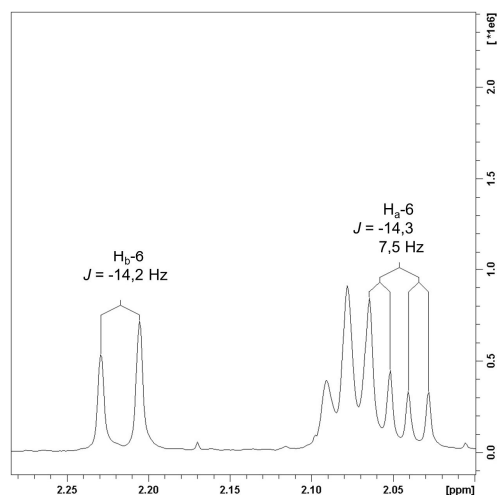
Der Vergleich mit den bereits bekannten PPAPs vom A-Typ **Uralion A** bis **D** (Zhou et al. 2016a) zeigt, dass aufgrund der geringeren Ringspannung im Tetrahydropyran-Ring die Tieffeldverschiebung der quartären C-Atome weniger stark ausgeprägt ist:  $\delta_{\text{C-2''}}$  90,1 ppm und  $\delta_{\text{C-3''}}$  70,8 ppm (Substanz **1**) sowie  $\delta_{\text{C-2''}}$  68,1 ppm und  $\delta_{\text{C-3''}}$  82,5 ppm (**Uralion A**). Somit konnte für die hier isolierte Substanz die Bildung eines Furan-Ringes angenommen werden.

Die relative Lage des Protons an C-2''' konnte mithilfe von NOESY-Daten ermittelt werden. Kreuzsignale zu den beiden Methylgruppen H<sub>3</sub>-4''' ( $\delta_{\text{H}}$  1,22 ppm) und H<sub>3</sub>-5''' ( $\delta_{\text{H}}$  1,38 ppm) und zu einem Proton der Methylengruppe C-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,22 ppm) manifestieren die  $\alpha$ -Orientierung des Wasserstoffatoms (**Abbildung 70**).



**Abbildung 70** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **1** mit Kreuzsignalen (grün) von H-2''' und H<sub>b</sub>-6, H<sub>3</sub>-4''' und H<sub>3</sub>-5'''; grün-blaue Signale sind Korrelationen zu den benachbarten Protonen an C-1'''

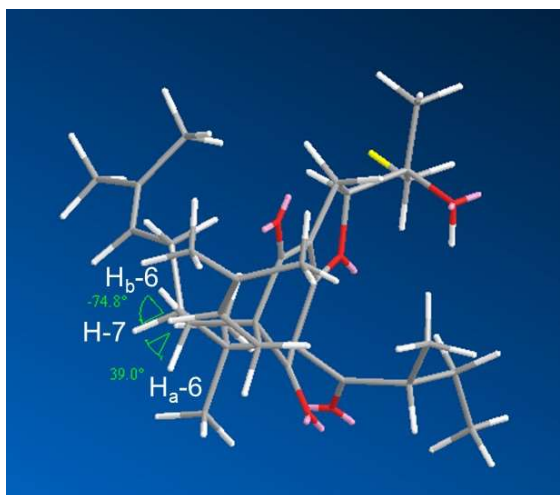
Für das Chiralitätszentrum C-7 war die Auswertung der NOESY-Daten wenig aufschlussreich und ließ keine Aussage über die Konfiguration zu. Aufgrund dessen wurde das Aufspaltungsmuster der Protonen H<sub>2</sub>-6 betrachtet und daraus die Kopplungskonstanten ermittelt. Für das Wasserstoffatom H<sub>a</sub>-6 ergab sich ein Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von -14,3 und 7,5 Hz, das geminale Proton H<sub>b</sub> zeigte ein Dublett mit -14,2 Hz, was allerdings in der Realität vermutlich auch ein Dublett vom Dublett mit einer sehr kleinen Kopplungskonstante ist (**Abbildung 71**).



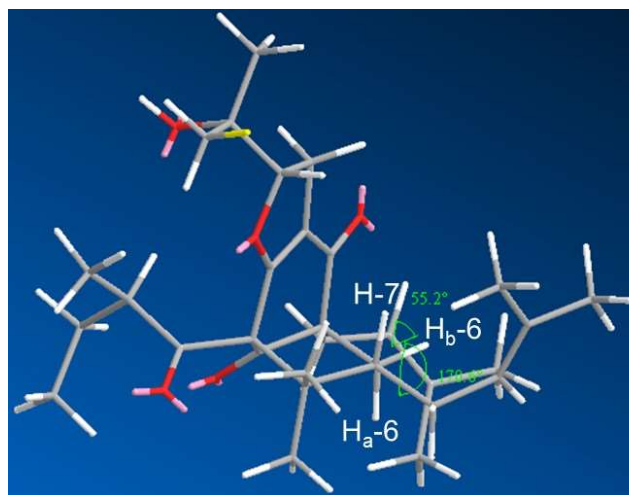
**Abbildung 71** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **1** mit dem Aufspaltungsmuster und den Kopplungskonstanten der Protonen  $\text{H}_{\text{a-6}}$  und  $\text{H}_{\text{b-6}}$

Mithilfe eines dreidimensionalen Modells der Struktur konnten die Diederwinkel zwischen den vicinalen Protonen  $\text{H}_{\text{a/b-6}}$  und  $\text{H-7}$  vermessen, anhand der Karplus-Kurve auf die Kopplungskonstanten geschlossen und abschließend mit den realen Werten verglichen werden. In **Abbildung 72** sind zum einen die Diederwinkel für eine  $R^*$ -Konfiguration (**a**), zum anderen für eine  $S^*$ -Konfiguration (**b**) dargestellt.

**a**



**b**



**Abbildung 72** Dreidimensionales Modell von **1** mit den Diederwinkeln (grün) zwischen den vicinalen Protonen  $\text{H}_{\text{a/b-6}}$  und  $\text{H-7}$  bei einer  $R^*$ -(**a**) und einer  $S^*$ -Konfiguration (**b**) an C-7; in grau ist das Kohlenstoffgrundgerüst dargestellt, weiß entspricht jeweils einem Proton, rot einem Sauerstoffatom und pink sind die freien Elektronenpaare

Im ersten Fall (**a**) liegt ein 39°-Winkel zwischen H<sub>a</sub>-6 und H-7 vor, was einer Kopplungskonstante zwischen 5 und 9 Hz entspricht. H<sub>b</sub>-6 und H-7 ergeben etwa einen 75°-Winkel, der zu einer Kopplungskonstante <1 Hz führt. Für die andere Möglichkeit (**b**) konnten Winkel von 170° und 55° gemessen werden, woraus eine sehr große Kopplungskonstante >10 Hz und eine mittlere (3 - 6 Hz) resultieren würde. Der Vergleich mit den Messdaten ergibt, dass das Stereozentrum C-7 *R*\*-konfiguriert sein muss.

So ergibt sich für das Molekül eine relative Stereochemie von 1*R*\*, 5*S*\*, 7*R*\* und 2''*S*\*.

Substanz **1** wird als (2*S*\*,3*aS*\*,5*R*\*,7*R*\*)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-6,6-dimethyl-5,9-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)-2,3,4,5,6,7-hexahydro-8*H*-3*a*,7-methanocycloocta[*b*]furan-8,10-dion bestimmt und erhält den Trivialnamen **Hirsutinan A**. Es ist ein bisher nicht beschriebener Naturstoff.

Es wurde bereits eine strukturell gleiche Substanz aus einer *Garcinia*-Art isoliert, das **Garsubellin B** (Fukuyama et al. 1998). Beim Vergleich der NMR-Daten fallen allerdings einige Unterschiede auf: so ist C-7 in Substanz **1** mit  $\delta_C$  47,1 ppm weiter ins Tieffeld verschoben als bei **Garsubellin B** ( $\delta_C$  43,0 ppm). Auch die Kohlenstoffatome C-10 und C-11 weisen abweichende Verschiebungen auf ( $\delta_C$  22,1 und 26,6 ppm bei **1** sowie  $\delta_C$  16,5 und 23,1 ppm für **Garsubellin B**). Die Protonen der Methylengruppe H<sub>2</sub>-6 zeigen relativ ähnliche Verschiebungen für Substanz **1** ( $\delta_H$  2,05 und 2,22 ppm), wohingegen sie sich in **Garsubellin B** deutlich unterscheiden ( $\delta_H$  1,29 und 1,92 ppm). Diese Indizien lassen vermuten, dass eine veränderte Konfiguration an C-7 vorliegt. Bestätigt wird dies durch Grossman und Jacobs (2000). Sie zeigten, dass diese Veränderungen sowohl bei den beiden bizyklischen Acylphloroglucinolen vom C-Typ, **Nemoroson** und **7-epi-Nemoroson**, als auch bei den korrespondierenden A-Typ Acylphloroglucinolen, **Nemoroson II** und **7-epi-Nemoroson II**, zu beobachten ist. Diese Tatsache bestätigt die *R*\*-Konfiguration an C-7.

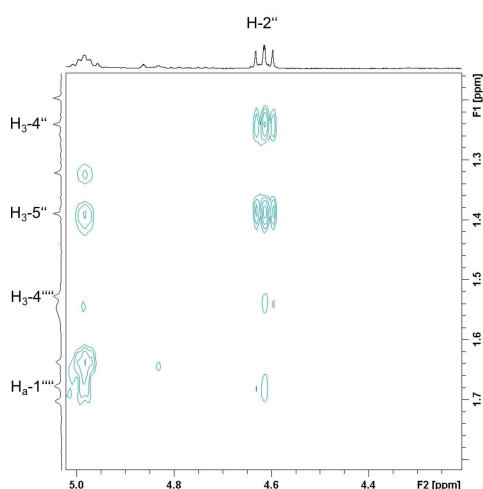
Die Ausbildung einer zusätzlichen Furano-Einheit ausgehend von einem Prenylrest an C-5 und anschließender *para*-Kopplung ist auch für einige Acylphloroglucinole aus *Hypericum*-Arten bekannt. Das prominenteste ist wohl das **Furohyperforin**, das 1998 als Oxidationsprodukt des Hyperforins aus *H. perforatum* isoliert wurde (Trifunović et al. 1998).

## Substanz 2

Substanz **2** ergab ein pseudomolekulares Ion [M+Na]<sup>+</sup> bei *m/z* 507,3082 (berechnet 507,3081) im ESI-HRMS, woraus sich die Summenformel C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub> errechnet.

Wie für Substanz **1**, konnte auch für **2** ein aliphatischer Acylrest an Position 1 ( $\delta_C$  80,9 ppm) ermittelt werden. Dieser entspricht in diesem Fall einer Isobutyryl-Untereinheit, was an zwei Dubletts bei  $\delta_H$  1,03 und 1,14 ppm und den entsprechenden HMBC-Korrelationen zu C-1' und C-2' auszumachen ist. Analog zum  $^1H$ -NMR-Spektrum von **1**, zeigte auch das von **2** zwei Triplets im Bereich  $\delta_H \sim 5$  ppm. Das eine ( $\delta_H$  4,99 ppm) spiegelt die Isopreneinheit an C-7 wieder, das andere ( $\delta_H$  5,12 ppm) ergab im HMBC-Spektrum Kreuzsignale mit C-4 ( $\delta_C$  177,9 ppm), C-5 ( $\delta_C$  52,9 ppm), C-6 ( $\delta_C$  38,3 ppm) und C-9 ( $\delta_C$  206,6 ppm) und offenbarte so die Verknüpfung mit C-5. Da sich im Übrigen die NMR-Daten von **1** und **2** sehr ähneln, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei beiden um ähnliche Substanzen mit unterschiedlichem Acylrest handelt. In diesem Fall kam der zusätzliche Ringschluss zu einer Dihydrofuran-Einheit durch einen Prenylrest an C-3, der ebenfalls an die *para*-Position gebunden ist, zustande.

Auf die Konfiguration am Stereozentrum C-2'' konnte in diesem Fall wieder aufgrund von NOE-Effekten des Protons H-2'' ( $\delta_H$  4,62 ppm) geschlossen werden. In **Abbildung 73** sind ausgeprägte Kreuzsignale zu den Methylgruppen H<sub>3</sub>-4'' ( $\delta_H$  1,24 ppm) und H<sub>3</sub>-5'' ( $\delta_H$  1,39 ppm) zu sehen, aber auch Korrelationen zu H<sub>3</sub>-4'''' ( $\delta_H$  1,53 ppm) und H<sub>a</sub>-1'''' ( $\delta_H$  1,67 ppm) sind sichtbar und legen damit die  $\alpha$ -Orientierung des Protons fest.



**Abbildung 73** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **2** mit Kreuzsignalen von H-2'' zu H<sub>3</sub>-4'', H<sub>3</sub>-5'', H<sub>a</sub>-1'''' und H<sub>3</sub>-4''''

Auch zu **2** konnten strukturell gleiche Substanzen in der Literatur gefunden werden. Abermals handelt es sich dabei um die aus *Garcinia subelliptica* isolierten Garsubelline, in diesem Fall

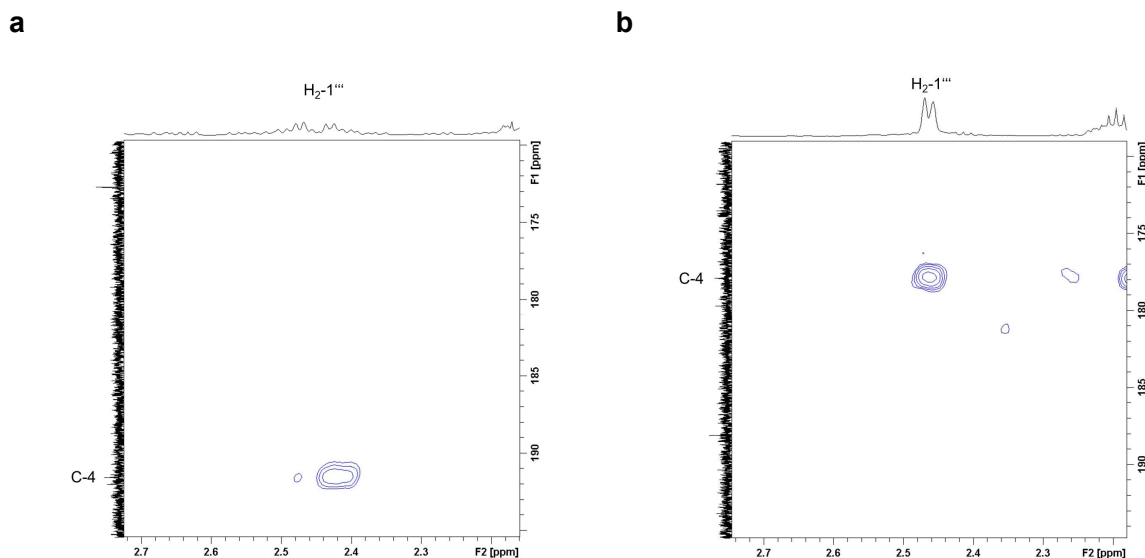
**Garsubellin C** und **D** (Fukuyama et al. 1998). Die beiden Verbindungen unterschieden sich lediglich in der Konfiguration an C-2“, wobei **Garsubellin C** wie Substanz **2** eine  $R^*$  Konfiguration aufweist. Die Gegenüberstellung der ermittelten NMR-Daten mit den in der Literatur veröffentlichten ergab wieder deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Kohlenstoffatome C-7, C-10 und C-11 sowie der Protonen H<sub>2</sub>-6. Analog zu **1** konnte auch in diesem Fall das Stereozentrum C-7 als  $R^*$  charakterisiert werden. Zusammenfassend kann die relative Stereochemie der Substanz damit als  $1R^*$ ,  $5R^*$ ,  $7R^*$  und  $2''R^*$  beschrieben werden.

Bei der Verbindung handelt es sich daher um  $(2R^*,5R^*,7R^*,9R^*)$ -2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-5-isobutyryl-6,6-dimethyl-7,9-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-3,5,6,7,8,9-hexahydro-5,9-methanocycloocta[b]furan-4,10(2*H*)-dion, welches den Trivialnamen **Hirsutinan B** erhält und trotz intensiver Literaturrecherche bislang unbekannt ist.

### Substanz 3

Die Summenformel C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub> für Substanz **3** ergab sich aus dem per ESI-HRMS ermittelten Pseudomolekülion mit  $m/z$  521,3239 [M+Na]<sup>+</sup> (berechnet 521,3237).

Entsprechend Substanz **2** konnte ein Acylrest in Position 1 und zwei Isopreneinheiten an C-5 und C-7 ermittelt werden. Da auch sonst die NMR-Daten von **2** und **3** viele Gemeinsamkeiten aufweisen, wurde wieder ein zusätzlicher Ringschluss, der einen Tetrahydrofuran-Ring bildet, vermutet. Aufgrund der Tatsache, dass die Methylenprotonen H<sub>2</sub>-1““ ( $\delta_H$  2,42 und 2,49 ppm) des Isoprenrests an C-5 in diesem Fall ein HMBC-Kreuzsignal mit einem quartären Kohlenstoffatom mit  $\delta_C$  191,5 ppm ergeben und nicht wie in **2** mit einem Kohlenstoff, welches bei  $\delta_C$  177,9 ppm zur Resonanz kommt, ist anzunehmen, dass der Ringschluss durch den Isoprensubstituenten an C-3 mit der *ortho*-Position stattfindet (**Abbildung 74**).

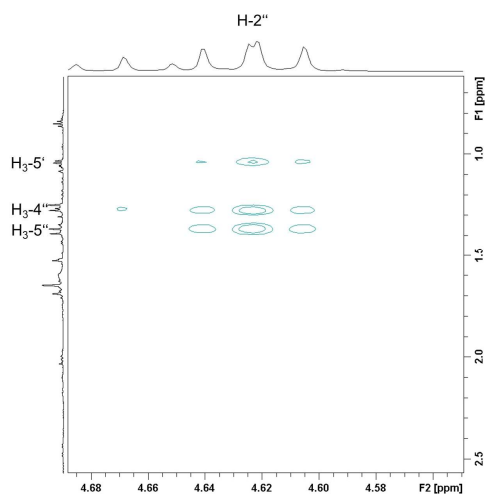


**Abbildung 74** Ausschnitt aus den HMBC-Spektren von **3** (a) und **2** (b) mit Korrelation der Methylenprotonen H<sub>2</sub>-1'' und C-4

Einige strukturell ähnliche Substanzen wurden aus *H. monogynum* (Xu et al. 2015) und *H. scabrum* (Gao et al. 2016a; Yang et al. 2016) isoliert. Die relative Konfiguration der anomeren C-Atome C-1 und C-5 ergibt sich aus dem starren, bizyklischen Grundkörper, die Stereochemie an C-7 und C-2'' soll mithilfe von NOESY- und Literaturdaten abschließend geklärt werden. Xu und Mitarbeiter (2015) gehen bei der Substanz **Hypermongon B** auf die unterschiedliche Orientierung des Protons an C-2'' ein. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass das Proton bei einer  $\alpha$ -Orientierung etwas weiter tieffeldverschoben vorliegt im Vergleich zur  $\beta$ -Orientierung ( $\delta_{\text{H}}$  4,76 ppm ( $\alpha$ ) und 4,62 ppm ( $\beta$ )). Außerdem verringert sich die Differenz der Verschiebungen der beiden Nachbarprotonen an C-1'' ( $\Delta \sim 0,03$  ppm ( $\alpha$ ) und  $\Delta \sim 0,16$  ppm ( $\beta$ )). In Substanz **1** liegt die Verschiebung des Protons bei  $\delta_{\text{H}-2''}$  4,62 ppm, was eindeutig für die  $\beta$ -Konfiguration spricht. Allerdings beträgt die Differenz der Verschiebungen hier nur 0,08 ppm.

Im NOESY-Spektrum sind Signale ähnlicher Intensität vom betroffenen Proton zu den beiden Methylgruppen H<sub>3</sub>-4'' ( $\delta_{\text{H}}$  1,28 ppm) und H<sub>3</sub>-5'' ( $\delta_{\text{H}}$  1,36 ppm) und der Methylgruppe H<sub>3</sub>-5' ( $\delta_{\text{H}}$  1,03 ppm) des Acylrest, aber nicht zum Isoprenrest an C-7, wie für Substanz **2**, auszumachen (**Abbildung 75**). Daraus erschloss sich die Annahme der  $\beta$ -Orientierung für das Proton.





**Abbildung 75** Ausschnitt aus dem NOESY Spektrum von **3** mit Korrelationen von H-2'' und H<sub>3</sub>-5', H<sub>3</sub>-4'' und H<sub>3</sub>-5''

Auch bei diesem Furano-Acylphloroglucinol vom A-Typ fiel beim Vergleich der NMR-Daten mit der Literatur die Diskrepanz in der chemischen Verschiebung einiger Atome auf, woraus sich auch hier die *R*<sup>\*</sup>-Konfiguration für das Chiralitätszentrum C-7 und damit die relative Stereochemie 1*S*<sup>\*</sup>, 5*R*<sup>\*</sup>, 7*R*<sup>\*</sup> und 2''*R*<sup>\*</sup> für das Gesamtmolekül ergibt.

Die Struktur von **3** wird somit als (2*R*<sup>\*</sup>,5*R*<sup>\*</sup>,7*R*<sup>\*</sup>,9*S*<sup>\*</sup>)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-8,8-dimethyl-5,7-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-9-(2-methylbutanoyl)-3,5,6,7,8,9-hexahydro-5,9-methanocycloocta[*b*]furan-4,10(2*H*)-dion festgelegt und bekommt in systematischer Reihenfolge den Trivialnamen **Hirsutinan C**.

## 2.3.2.3 Substanz 4

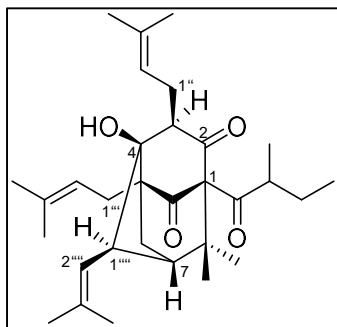


Abbildung 76 Strukturformel der isolierten Substanz 4

Tabelle 41  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanz 4; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

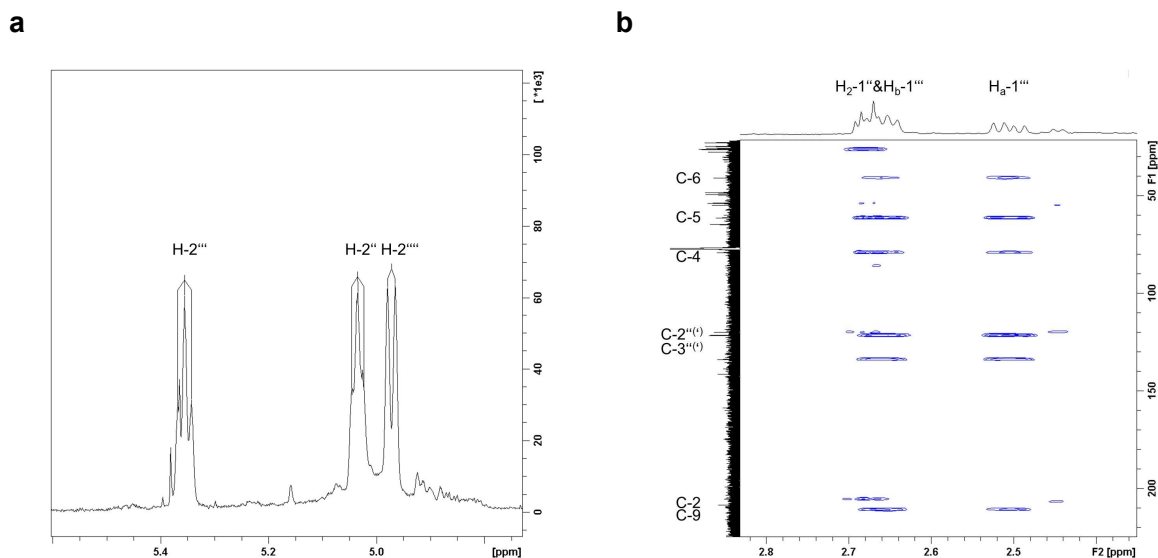
| Substanz 4                           |      |                     |  |
|--------------------------------------|------|---------------------|--|
|                                      | C/H  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                |
| Typ-A-Acylphloroglucinol-Grundgerüst | 1    | 85,9                |  |
|                                      | 2    | 205,2               |  |
|                                      | 3    | 64,6                | 2,68 (1H, m)   |
|                                      | 4    | 79,0                |  |
|                                      | 5    | 61,2                |  |
|                                      | 6    | 40,8                | a 1,94 (1H, d, -14,0)<br>b 2,18 (1H, dd, 3,8, -13,2) |
|                                      | 7    | 54,7                | 1,40 (1H, d, 3,6)                                    |
|                                      | 8    | 49,3                |  |
|                                      | 9    | 210,8               |  |
|                                      | 10   | 22,8                | 1,20 (3H, s)   |
|                                      | 11   | 24,7                | 1,13 (3H, s)   |
| Acyl-Seitenkette                     | 1'   | 208,3               |  |
|                                      | 2'   | 48,3                | 1,83 (1H, m)   |
|                                      | 3'   | 26,3                | 2,01 (2H, m)   |
|                                      | 4'   | 11,6                | 0,88 (3H, t, 7,5)                                    |
|                                      | 5'   | 17,7                | 0,92 (3H, d, 6,5)                                    |
| Isopren I                            | 1''  | 26,2                | 2,67 (2H, m)   |
|                                      | 2''  | 119,9               | 5,03 (1H, t, 6,8)                                    |
|                                      | 3''  | 133,8               |  |
|                                      | 4''  | 18,0                | 1,55 (3H, s)   |
|                                      | 5''  | 25,6                | 1,66 (3H, s)   |
| Isopren II                           | 1''' | 27,6                | a 2,51 (1H, dd, 7,8, -14,8)<br>b 2,66 (1H, m)        |
|                                      | 2''' | 121,4               | 5,36 (1H, t, 7,6)                                    |
|                                      | 3''' | 133,7               |  |
|                                      | 4''' | 17,9                | 1,69 (3H, s)   |
|                                      | 5''' | 26,1                | 1,74 (3H, s)   |

Fortsetzung Tabelle 39

|             |             |       |                         |
|-------------|-------------|-------|-------------------------|
| Isopren III | <b>1'''</b> | 53,7  | 2,90 (1H, dd, 1,6, 8,8) |
|             | <b>2'''</b> | 121,3 | 4,97 (1H, d, 8,6)       |
|             | <b>3'''</b> | 141,2 |                         |
|             | <b>4'''</b> | 19,2  | 1,67 (3H, s)            |
|             | <b>5'''</b> | 26,1  | 1,83 (3H, s)            |
|             | <b>4-OH</b> |       | 2,29 (1H, s)            |

Für Substanz **4** wurde auf Basis eines Pseudomoleküliions mit  $m/z$  505,3284  $[M+Na]^+$  (berechnet 505,3288) im ESI-HRMS die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_4$  errechnet. Die Auswertung des HSQC-Spektrums führte zur Identifizierung von zehn quartären Kohlenstoffatomen, sieben Methin-, vier Methylen- und zehn Methylgruppen.

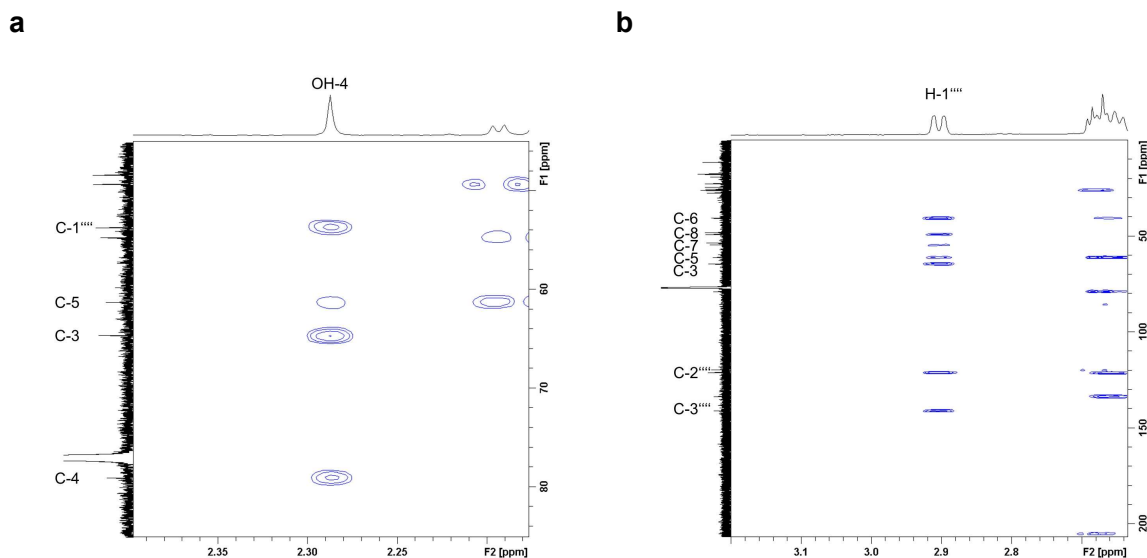
Aus den 1D- und 2D-NMR-Daten von **4** konnte wie für die Verbindungen **1** bis **3** auch ein Acylphloroglucinol vom A-Typ, welches eine 2-Methylbutyryl-Einheit als Startersäure an C-1 besitzt und an C-7 prenyliert ist, ermittelt werden. Zusätzlich konnten zwei weitere olefinische Protonen H-2'' ( $\delta_H$  5,03 ppm) und H-2''' ( $\delta_H$  5,36 ppm) im  $^1H$ -NMR-Spektrum identifiziert werden. Durch HMBC-Korrelation von H<sub>2</sub>-1'' ( $\delta_H$  2,67 ppm) zu C-2 ( $\delta_C$  205,2 ppm) und C-4 ( $\delta_C$  79,0 ppm) sowie von H<sub>2</sub>-1''' ( $\delta_H$  2,51 und 2,66 ppm) zu C-4, C-5 ( $\delta_C$  61,2 ppm), C-6 ( $\delta_C$  40,8 ppm) und C-9 ( $\delta_C$  210,8 ppm) wurde die Verknüpfung der Isoprenreste an C-3 ( $\delta_C$  64,6 ppm) und C-5 ( $\delta_C$  61,2 ppm) ersichtlich (**Abbildung 77, b**).



**Abbildung 77** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ - (a) und HMBC-Spektrum (b) von **4** mit den Signalen der olefinischen Protonen  $\text{H-2}''$ ,  $\text{H-2}'''$  und  $\text{H-2}'''$  sowie den Korrelationen der Methylenprotonen  $\text{H}_2\text{-1}''$  und  $\text{H}_2\text{-1}'''$  zu den Kohlenstoffatomen C-2, C-4, C-2''' und C-3''' bzw. C-4, C-5, C-6, C-9, C-2''' und C-3'''

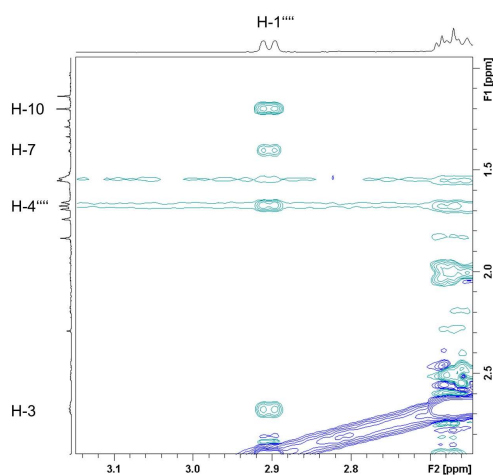
Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum fiel auf, dass das olefinische Proton  $\text{H-2}'''$  ( $\delta_{\text{H}}$  4,97 ppm) nicht als charakteristisches Triplet, sondern als Dublett vorliegt (**Abbildung 77, a**). Diese Tatsache deutet auf ein Methin-Kohlenstoffatom  $\text{C-1}'''$  ( $\delta_{\text{C}}$  53,7 ppm), was durch das im HSQC-Spektrum gefundene Proton  $\text{H-1}'''$  ( $\delta_{\text{H}}$  2,90 ppm) bestätigt werden konnte.

Im Protonenspektrum konnte außerdem ein H-Atom ( $\delta_{\text{H}}$  2,29 ppm) identifiziert werden, das nicht an ein Kohlenstoffatom gebunden vorlag und somit für eine Hydroxygruppe sprach. Dieses Proton zeigt Kreuzsignale zu C-3, C-4, C-5 und auch  $\text{C-1}'''$  (**Abbildung 78, a**), was für eine Verknüpfung der Hydroxygruppe an C-4 spricht und außerdem einen zusätzlichen Ringschluss zwischen C-4 und  $\text{C-1}'''$  andeutet. Durch Korrelationen von H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,40 ppm) zu C-4 und zusätzlich von  $\text{H-1}'''$  zu C-3, C-4 und C-5 wurde diese Annahme untermauert (**Abbildung 78, b**).



**Abbildung 78** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **4** mit Kreuzsignalen der OH-Gruppe an C-4 mit C-3, C-4, C-5 und C-1'''' (a) sowie des Methinprotons H-1'''' und C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-2'''' und C-3'''' (b)

Die relative Konfiguration an den Stereozentren C-1, C-4, C-5 und C-7 wird durch das starre, trizyklische Grundgerüst selbst festgelegt. Die Konfigurationen an C-3 und C-1'''' konnten durch intensive Auswertung der NOESY-Daten ermittelt werden. NOE-Interaktion zwischen H-1'''' ( $\delta_{\text{H}}$  2,90 ppm) und H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  1,20 ppm) sprechen für eine *R*\*-Konfiguration an C-1'''' und ein deutliches Signal von H-1'''' und H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  2,68 ppm) bestätigt die *R*\*-Konfiguration an C-3.



**Abbildung 79** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **4** mit Signalen von H-1'''' zu H-3, H-7, H-10 und H-4''''

Zusammenfassend lässt sich damit eine relative Stereochemie für die Struktur von **4** von  $1R^*$ ,  $3R^*$ ,  $4S^*$ ,  $5R^*$ ,  $7S^*$  und  $1''''R^*$  festlegen.

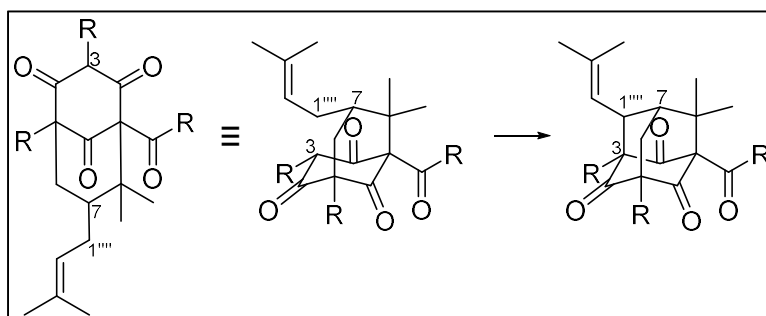
Daher wird die Verbindung als  $(1R^*, 2S^*, 3aR^*, 5R^*, 7R^*, 7aS^*)$ -7a-Hydroxy-8,8-dimethyl-3a,7-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-5-(2-methylbutanoyl)-1-(2-methylprop-1-en-1-yl)hexahydro-4*H*-2,5-methanoindene-4,6(5*H*)-dion identifiziert. Als Trivialname wird **Hyperihirsutol** gewählt.

Trotz sorgfältiger Literaturrecherche konnte kein vergleichbares Acylphloroglucinol mit diesem komplexen, trizyklischen Grundkörper gefunden werden. Somit wird hier nach bestem Wissen zum ersten Mal von einem Acylphloroglucinol vom A-Typ mit einem zusätzlichen Cyclopentan-Ring dieser Art berichtet.

### 2.3.3 Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ

Die folgenden fünf isolierten Substanzen **5** bis **9** leiten sich von einem Tricyclo[3.3.1.<sup>1,3,7</sup>]decan-Körper, trivial auch als Adamantan bezeichnet, ab.

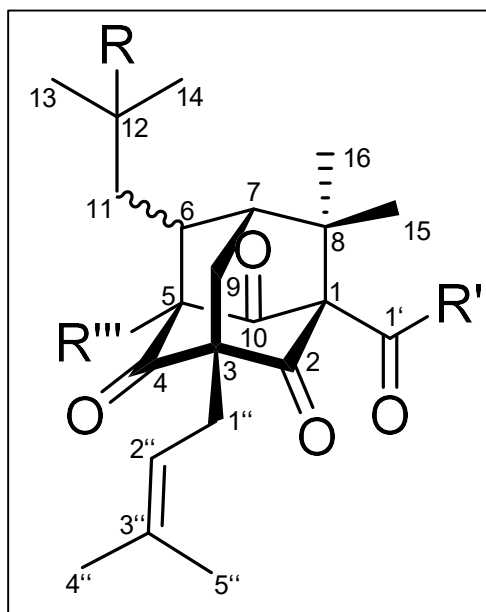
Dieser komplexe, trizyklische Grundkörper bildet sich ausgehend von einem Acylphloroglucinol vom Typ A mit einer Prenylierung an C-7. Dabei kommt es zum Ringschluss zwischen C-3 des Grundkörpers und C-1<sup>'''</sup> der Prenyleinheit (**Abbildung 80**).



**Abbildung 80** Bildung des Adamantan-Grundgerüsts ausgehend von einem bityklischen, polyprenylierten Acylphloroglucinol vom Typ A

#### 2.3.3.1 Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts

Entsprechend der Substitution des Phloroglucin-Grundkörpers mit zwei Prenyleinheiten und der darauffolgenden Zyklisierung zum komplexen, trizyklischen Adamantan-Gerüst ergeben sich eine Isobutyl-Untereinheit an C-6 und geminale Methylgruppen an C-8. Der aliphatische Acylrest ist in Position 1 zu finden und alle isolierten Substanzen vom Adamantan-Typ weisen einen freien Prenylrest an C-3 auf, woraus sich folgendes Skelett für die Substanzen **5** bis **9** ergibt:

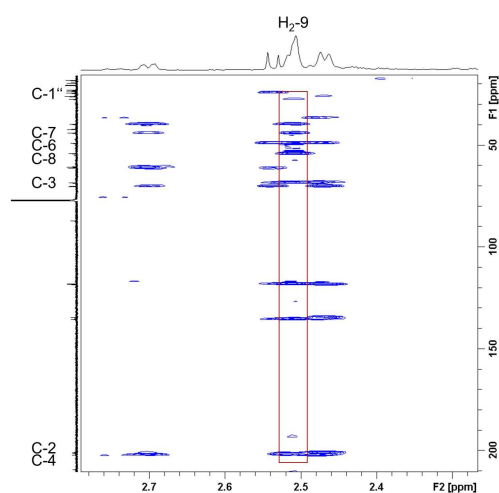
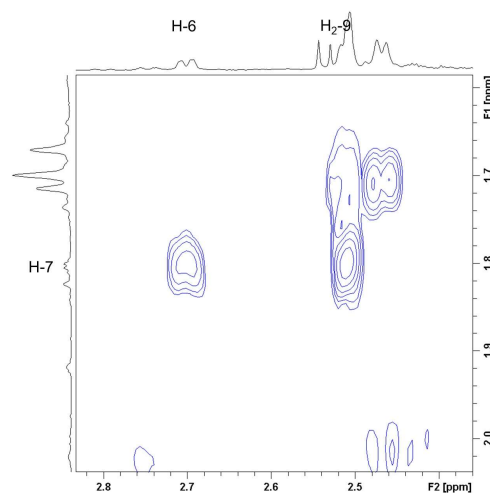


**Abbildung 81** Grundkörper der Substanzen **5** bis **9**: Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ

Die Komplexität des Grundkörpers mit den zahlreichen quartären Kohlenstoffatomen hat einen erschwerenden Einfluss auf die Strukturaufklärung. So können zum einen kaum sich aneinander-reihende Protonen im COSY-Spektrum ermittelt werden, zum anderen ist es von vielen C-Atomen nicht möglich, HMBC-Kreuzsignale in die nähere Umgebung zu detektieren.

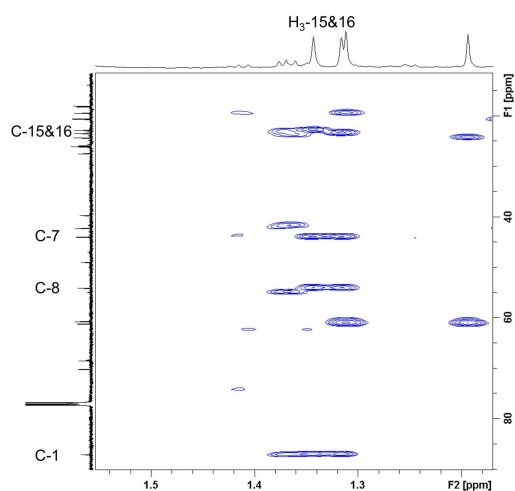
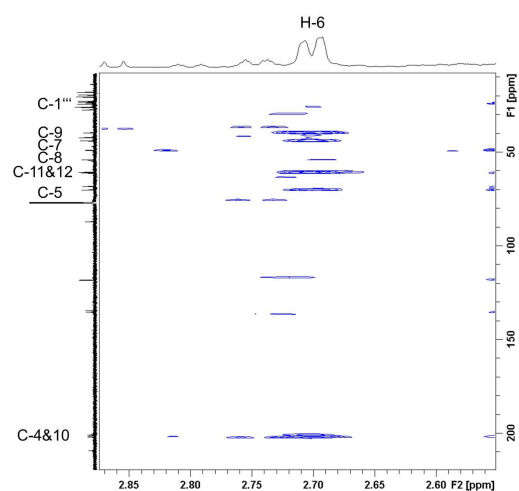
Richtungsweisend erweisen sich die HMBC-Korrelationen ausgehend von der Methylengruppe H<sub>2</sub>-9, die eine zentrale Position einnimmt. Problematisch sind jedoch die sich häufig stark über-lappenden Signale zahlreicher anderer Protonen. In **Abbildung 82 (a)** sind die Korrelationen der im Mittelpunkt befindlichen Methylengruppe H<sub>2</sub>-9 und den Kohlenstoffatomen des Phloroglucin-Grundkörpers C-2, C-3 und C-4, den C-Atomen C-6, C-7 und C-8 und dem Methylenkohlenstoffatom des Isoprenrests C-1'' dargestellt. Die Anordnung der Protonen H<sub>2</sub>-9, H-7 und H-6 kann durch Kreuzsignale im COSY-Spektrum ermittelt werden (**Abbildung 82, b**).



**a****b**

**Abbildung 82** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **5** mit Korrelationen von der Methylengruppe H<sub>2</sub>-9 und C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-8 und C-1'' (**a**) und Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **5** mit Kreuzsignalen zwischen dem Proton H-7 und den Protonen H-6 und H<sub>2</sub>-9 (**b**)

Das HMBC-Spektrum gibt außerdem Aufschluss darüber, welche C-Atome den geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-15 und H<sub>3</sub>-16 benachbart sind (**Abbildung 83, a**) und zeigt die Nähe des Protons H-6 zu den Kohlenstoffatomen C-4, C-5, C-7, C-9, C-11, C-12 und oft nur sehr schwach zu C-8, C-10 und C-1'' (**Abbildung 83, b**). Zusätzlich konnte anhand der Kreuzsignale der beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-13 und H<sub>3</sub>-14 mit C-11 und C-12 die Lage der 2-Methylpropyl-Untereinheit bestimmt werden.

**a****b**

**Abbildung 83** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **5** mit Kreuzsignalen zwischen den beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-15 und H<sub>3</sub>-16 und C-1, C-7, C-8 und C-15 oder C-16 (**a**) sowie von H-6 und C-4, C-5, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12 und C-1''' (**b**)

Auch die in **Kapitel 2.3.1**, S. 91 beschriebenen Strukturelemente konnten identifiziert und deren Substitutionsstellen anhand der HMBC-Daten ermittelt werden.

Die relative Konfiguration der Stereozentren C-1, C-3, C-5 und C-7 des komplexen, trizyklischen Grundkörpers werden aufgrund der Starrheit des Adamantans festgelegt. Alle weiteren wurden anhand von NOE-Effekten und Literaturangaben ermittelt.

## 2.3.3.2 Substanzen 5, 6 und 7

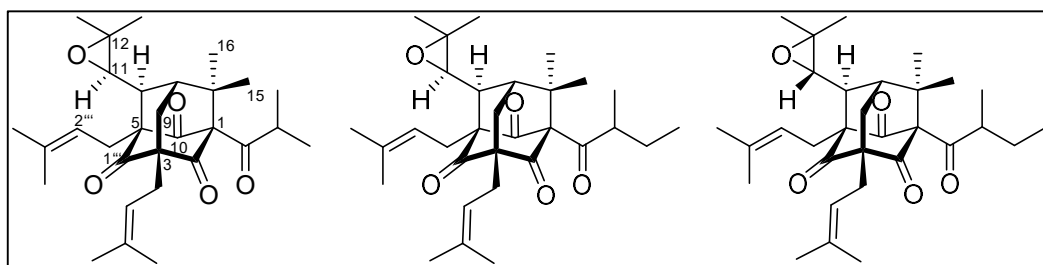


Abbildung 84 Strukturformeln der isolierten Substanzen 5, 6 und 7

Tabelle 42  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 5, 6 und 7; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

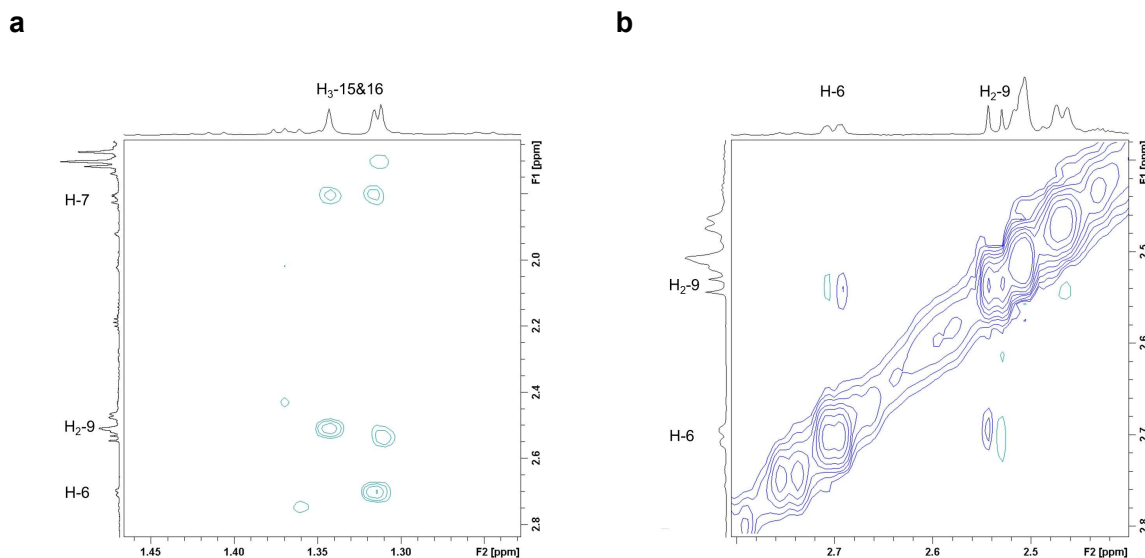
|                       | Substanz 5 |                     |                                       | Substanz 6          |  |                     | Substanz 7   |  |  |
|-----------------------|------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|--|---------------------|--|--|--|
|                       | C/H        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)  |  |  |
| Adamantan Grundgerüst | 1          | 87,1                |                                       | 86,8                |  | 86,4                |  |  |  |
|                       | 2          | 201,5               |                                       | 201,4               |  | 201,7               |  |  |  |
|                       | 3          | 68,5                |                                       | 68,5                |  | 68,2                |  |  |  |
|                       | 4          | 202,0               |                                       | 202,1               |  | 202,0               |  |  |  |
|                       | 5          | 70,2                |                                       | 70,2                |  | 72,0                |  |  |  |
|                       | 6          | 49,0                | 2,70 (1H, dd, 2,3, 8,4)               | 48,9                | 2,71 (1H, d, 8,3)                                      | 54,6                | 2,48 (1H, dt, 2,6, 8,3)  |  |  |
|                       | 7          | 44,0                | 1,80 (1H, q, 2,7)                     | 44,0                | 1,80 (1H, q, 2,6)                                      | 45,7                | 1,62 (1H, q, 2,6)  |  |  |
|                       | 8          | 54,1                |                                       | 54,1                |  | 53,9                |  |  |  |
|                       | 9          | 39,7                | 2,51 (2H, m)                          | 39,8                | 2,51 (2H, m)   | 40,3                | <sup>a</sup> 2,22 (1H, dd, 2,6, -14,0)<br><sup>b</sup> 2,54 (1H, dt, 2,7, -14,1) |  |  |
|                       | 10         | 200,9               |                                       | 200,9               |  | 199,9               |  |  |  |
|                       | 11         | 60,7                | 2,54 (1H, d, 8,4)                     | 60,7                | 2,54 (1H, d, 8,4)                                      | 61,6                | 2,61 (1H, d, 8,3)  |  |  |
|                       | 12         | 61,2                |                                       | 61,2                |  | 56,8                |  |  |  |
|                       | 13         | 19,4                | 1,19 (3H, s)                          | 19,4                | 1,19 (3H, s)   | 19,1                | 1,27 (3H, s)   |  |  |
|                       | 14         | 24,3                | 1,31 (3H, s)                          | 24,3                | 1,31 (3H, s)   | 24,6                | 1,31 (3H, s)   |  |  |
|                       | 15         | 22,8                | 1,32 (3H, s)                          | 22,9                | 1,32 (3H, s)   | 22,7                | 1,29 (3H, s)   |  |  |
|                       | 16         | 23,4                | 1,34 (3H, s)                          | 23,4                | 1,34 (3H, s)   | 23,1                | 1,33 (3H, s)   |  |  |
| Acyl-Seitenkette      | 1'         | 209,2               |                                       | 208,6               |  | 208,3               |  |  |  |
|                       | 2'         | 42,3                | 2,19 (1H, sept, 6,6)                  | 48,8                | 1,89 (1H, m)   | 48,7                | 1,96 (1H, ddd, 2,7, 6,6, 9,4)  |  |  |
|                       | 3'         | 20,6                | 1,14 (3H, d, 6,3)                     | 26,8                | <sup>a</sup> 1,30 (1H, m)<br><sup>b</sup> 1,88 (1H, m) | 26,8                | <sup>a</sup> 1,28 (1H, m)<br><sup>b</sup> 1,79 (1H, ddd, 2,3, 7,5, -13,4)        |  |  |
|                       | 4'         | 20,6                | 1,15 (3H, d, 6,4)                     | 11,7                | 0,85 (3H, t, 7,4)                                      | 11,8                | 0,85 (3H, t, 7,4)  |  |  |
|                       | 5'         |                     |                                       | 16,6                | 1,12 (3H, d, 6,5)                                      | 16,4                | 1,10 (3H, d, 6,6)  |  |  |
| Isopren I             | 1''        | 27,5                | 2,52 (2H, m)                          | 27,5                | 2,51 (2H, m)   | 27,3                | 2,52 (2H, m)   |  |  |
|                       | 2''        | 118,1               | 5,18 (1H, t, 7,2)                     | 118,1               | 5,18 (1H, t, 7,2)                                      | 118,3               | 5,18 (1H, t, 7,3)  |  |  |
|                       | 3''        | 135,4               |                                       | 135,3               |  | 135,3               |  |  |  |
|                       | 4''        | 18,0                | 1,67 (3H, s)                          | 18,0                | 1,67 (3H, s)   | 18,0                | 1,67 (3H, s)   |  |  |
|                       | 5''        | 26,0                | 1,71 (3H, s)                          | 26,0                | 1,71 (3H, s)   | 26,0                | 1,71 (3H, s)   |  |  |
| Isopren II            | 1'''       | 25,9                | 2,47 (2H, d, 6,6)                     | 25,9                | 2,48 (2H, d, 5,9)                                      | 26,9                | <sup>a</sup> 2,43 (1H, dd, 6,5, -15,5)<br><sup>b</sup> 2,74 (1H, dd, 6,5, -15,4) |  |  |
|                       | 2'''       | 118,3               | 5,03 (1H, t, 6,4)                     | 118,3               | 5,03 (1H, t, 6,3)                                      | 118,6               | 4,92 (1H, t, 6,4)  |  |  |
|                       | 3'''       | 134,6               |                                       | 134,5               |  | 134,2               |  |  |  |
|                       | 4'''       | 18,1                | 1,70 (3H, s)                          | 18,1                | 1,71 (3H, s)   | 18,2                | 1,74 (3H, s)   |  |  |
|                       | 5'''       | 26,0                | 1,70 (3H, s)                          | 26,0                | 1,70 (3H, s)   | 26,0                | 1,66 (3H, s)   |  |  |

### Substanz 5

Substanz **5** ergab im positiven ESI-HRMS ein pseudomolekulares Ion bei  $m/z$  483,3110  $[M+H]^+$  (berechnet 483,3105), woraus sich die Summenformel  $C_{30}H_{42}O_5$  berechnet. Die 30 im  $^{13}C$ -Spektrum detektierten Kohlenstoffatome zeigten sich im HSQC als elf quartäre, sechs tertiäre, drei sekundäre und zehn primäre C-Atome.

Neben dem Adamantan-Grundgerüst und den bereits genannten Substituenten in Position 1 (Isobutyryl-Acylrest) und 3 (Isoprenrest) konnte im  $^1H$ -NMR-Spektrum ein weiteres olefinisches Wasserstoffatom bei  $\delta_H$  5,03 ppm gefunden werden. Im HMBC-Spektrum wurden charakteristische Kreuzsignale zu den primären Kohlenstoffatomen C-4''' ( $\delta_C$  18,1 ppm) und C-5''' ( $\delta_C$  26,0 ppm) sowie zu C-1''' ( $\delta_C$  25,9 ppm) registriert. Ein weniger intensives Signal zu C-5 ( $\delta_C$  70,2 ppm) deutete die Position der Verknüpfung der zweiten Isopreneinheit an den Grundkörper an und wurde durch Peaks zwischen  $H_2$ -1''' ( $\delta_H$  2,47 ppm) und C-4 ( $\delta_C$  202,0 ppm), C-5, C-6 ( $\delta_C$  49,0 ppm) und C-10 ( $\delta_C$  200,9 ppm) bestätigt. Die Summenformel deutete ein zusätzliches Sauerstoffatom in der Struktur von **5** an und gemeinsam mit den entschirmten Positionen von C-11 ( $\delta_C$  60,7 ppm) und C-12 ( $\delta_C$  61,2 ppm) führte dies zur Identifizierung einer 11, 12-Oxiran-Untereinheit.

Wie bereits erwähnt, wird die relative Stereochemie an C-1, C-3, C-5 und C-7 durch das starre, trizyklische Grundgerüst festgelegt. Das Proton H-6 ( $\delta_H$  2,70 ppm) ließ sich mithilfe der vorhandenen NOESY-Daten als  $\alpha$ -orientiert bestimmen (**Abbildung 85**). Im Spektrum zeigten sich Korrelationen zwischen  $H_b$ -9 ( $\delta_H$  2,51 ppm) und  $H_3$ -15 ( $\delta_H$  1,34 ppm), zwischen  $H_3$ -16 ( $\delta_H$  1,32 ppm) und H-6 und es fehlte ein Signal zwischen H-6 und  $H_a$ -9 ( $\delta_H$  2,51 ppm), welches die  $\beta$ -Ausrichtung des Protons belegen würde.



**Abbildung 85** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **5** mit Korrelationen von H<sub>2</sub>-9 sowie H-7 und H<sub>3</sub>-15 und von H<sub>3</sub>-16 und sowohl H-7 als auch H-6 (a) und das fehlende Signal zwischen H<sub>2</sub>-9 und H-6 (b) (blau-grüne Signale verdeutlichen COSY-Korrelationen der benachbarten Protonen H-6 und H-11)

Aufgrund der freien Drehbarkeit der Bindung zwischen C-6 und C-11 gestaltete sich die Bestimmung der Stereochemie an C-11 sehr schwierig. Ye et al. (2016) zeigten, dass Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ mit einer 11,12-Epoxid-Struktur in zwei Gruppen unterteilt werden können. Die erste Gruppe beinhaltet Substanzen, deren chemische Verschiebung von C-6 im Bereich von 56 ppm und von C-12 um 58 ppm liegt, wohingegen die Verschiebungen der betreffenden Kohlenstoffatome bei den Substanzen der zweiten Gruppe ~50 und 62 ppm betragen. Da für Substanz **5** die Verschiebungen 49,0 und 61,2 ppm ermittelt wurden, konnte die relative Stereochemie an C-11 als *R*<sup>\*</sup> beschrieben werden. Somit ergeben sich für das Molekül die Konfigurationen 1*R*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup>, 5*R*<sup>\*</sup>, 6*S*<sup>\*</sup>, 7*R*<sup>\*</sup>, 11*R*<sup>\*</sup>.

Vergleiche mit Literaturdaten zeigen, dass es sich bei **5** um das bereits in *H. hookerianum* gefundene **Hookerion C** handelt (Ye et al. 2016).

### Substanz 6

Die Summenformel von Substanz **6** konnte mittels eines Pseudomoleküliions  $m/z$  497,3263  $[M+H]^+$  (berechnet 497,3262) im ESI-HRMS als  $C_{31}H_{44}O_5$  festgelegt werden.

Auffällig sind die Ähnlichkeiten der 1D- und 2D-NMR-Daten von **6** mit denen von Substanz **5**. Lediglich eine zusätzliche Methylengruppe ( $\delta_C$  26,8 ppm,  $\delta_H$  1,30 und 1,88 ppm) in der aliphatischen Acylseitenkette konnte gefunden werden, welche die Differenz von 14 Masseneinheiten ausmacht. Durch bereits bekannte, typische Verschiebungen der restlichen Kohlen- und Wasserstoffatome mit dazugehörigen HMBC-Korrelationen konnte die 2-Methylbutyryl-Untereinheit zweifelsfrei aufgeklärt werden.

Die Stereochemie konnte ebenfalls analog Substanz **5** als  $1R^*$ ,  $3S^*$ ,  $5R^*$ ,  $6S^*$ ,  $7R^*$ ,  $11R^*$  bestimmt werden.

Somit handelt es sich bei der Verbindung um  $(1R^*, 3S^*, 5R^*, 7R^*, 8S^*)$ -8-(( $R^*$ )-3,3-Dimethyloxiran-2-yl)-6,6-dimethyl-1,3-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-5-(2-methylbutanoyl)adamantan-2,4,9-trion, welches den Trivialnamen **Hirsuton A** erhält und ein bisher unbeschriebener Naturstoff ist.

### Substanz 7

Das ESI-HRMS von Substanz **7** zeigte ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  497,3263  $[M+H]^+$  (berechnet 497,3262), welches zur Berechnung der Summenformel  $C_{31}H_{44}O_5$  diente.

Die Aufklärung der Struktur führte zum gleichen Ergebnis wie für **6**: Ein Adamantan-Grundgerüst mit einem 2-Methylbutyryl-Acylrest, zwei Prenylresten und einer 11,12-Oxiran-Funktion. Ein Vergleich der Verschiebungen offenbarte indessen deutliche Unterschiede für C-6 ( $\delta_C$  48,9 ppm,  $\delta_H$  2,71 ppm für **6** und  $\delta_C$  54,6 ppm,  $\delta_H$  2,48 ppm für **7**) und C-12 ( $\delta_C$  61,2 ppm für **6** und  $\delta_C$  56,8 ppm für **7**). Gemäß Ye et al. (2016) kommt dieser Unterschied durch die Konfiguration an C-11 zustande, wodurch die hier vorliegende als  $S^*$  bestimmt werden konnte. H-6 konnte aufgrund von NOE-Signalen zwischen  $H_b$ -9 ( $\delta_H$  2,54 ppm) und  $H_3$ -16 ( $\delta_H$  1,33 ppm),  $H_3$ -15 ( $\delta_H$  1,29 ppm) und H-6 ( $\delta_H$  2,48 ppm) sowie dem fehlenden Signal zwischen H-6 und  $H_a$ -9 ( $\delta_H$  2,22 ppm) abermals als  $\alpha$ -konfiguriert beschrieben werden. Zusammenfassend weist **7** in den Stereozentren die relative Konfiguration  $1R^*$ ,  $3S^*$ ,  $5R^*$ ,  $6S^*$ ,  $7R^*$ ,  $11S^*$  auf.

Es handelt sich bei  $(1R^*, 3S^*, 5R^*, 7R^*, 8S^*)$ -8-(( $S^*$ )-3,3-dimethyloxiran-2-yl)-6,6-dimethyl-1,3-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-5-(2-methylbutanoyl)adamantane-2,4,9-trione um ein Epimer von **6**

und bekommt den Trivialnamen **Hirsuton B**. Auch dieser Sekundärmetabolit ist in der Literatur bislang unbekannt.

In der Literatur sind bereits für verschiedene *Hypericum*-Arten ähnliche Strukturen beschrieben, die allerdings oft im Acylrest abweichen und einen Benzoylrest besitzen. Aus *H. sampsonii*, einer Art aus Sektion 9c *Sampsonia*, konnten bereits zwei Derivate mit der Konfiguration anlog **7** isoliert werden, **Sampsonion Q** (Xiao et al. 2007; Zhu et al. 2014) und **Hyperisampsin G** (Zhu et al. 2014). Aber auch Substanzen mit der Konfiguration wie **5** und **6** konnten in *H. sampsonii* bereits gefunden werden. Zu nennen sind hier **Samsponion J** (Hu und Sim 1999a; Zhu et al. 2014) und **28,29-Epoxyplukenetion A** (Zhu et al. 2014), welches allerdings bereits 13 Jahre zuvor für eine Art aus der Familie der Clusiaceae beschrieben wurde (Christian et al. 2001). Auch aus dem sogenannten Blut-Johanniskraut (*H. androsaemum*, Sektion 5 *Androsaemum*) konnte bereits eine vergleichbare Verbindung isoliert werden: Das **Hyperandron A**, welches wie die bereits genannten Substanzen einen aromatischen Acylrest aufweist und an C-6 geranyliert ist (Wang et al. 2012). 2016 wurden für *H. hookerianum* aus Sektion 3 *Ascyreia* zahlreiche Verbindungen mit einer 11,12-Oxiranstruktur beschrieben (Ye et al. 2016). Die vier Derivate **Hookerion A-D** besitzen aliphatische Acylreste und zum Teil eine Geranyl- anstelle einer Prenyl-Einheit an C-3. Auch konnten unter den Substanzen beide möglichen Orientierungen für das Proton H-11 gefunden werden. Die vier isolierten Derivate mit aromatischer Acylstruktur waren alle bereits aus *H. sampsonii* bekannt. Auch konnten die Derivate mit Benzoylstruktur in *H. attenuatum* (Sektion 3 *Ascyreia*) (Li et al. 2015b) und *H. pseudohenryi* (Sektion 9 *Hypericum*) (Yang et al. 2017a) gefunden werden.

## 2.3.3.3 Substanzen 8 und 9

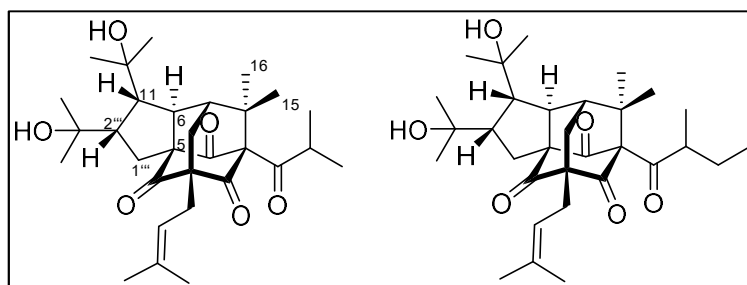


Abbildung 86 Strukturformeln der isolierten Substanzen 8 und 9

Tabelle 43  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 8 und 9; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

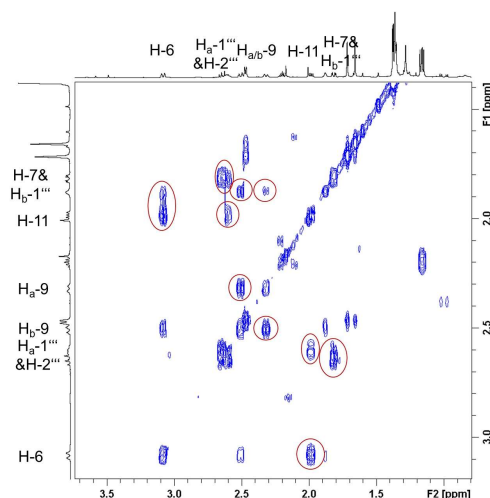
|                       |  | Substanz 8 |   | Substanz 9  |   |
|-----------------------|--|------------|---|---|---|
|                       |  | C/H        | $\delta_{\text{C}}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)           | $\delta_{\text{C}}$                                   | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                       |
| Adamantan Grundgerüst |  | 1          | 87,6  | 87,6  |   |
|                       |  | 2          | 201,6   | 201,6   |   |
|                       |  | 3          | 67,6  | 67,6  |   |
|                       |  | 4          | 201,1   | 201,1   |   |
|                       |  | 5          | 73,6  | 73,6  |   |
|                       |  | 6          | 57,0    3,08 (1H, dt, 1,9, 13,2)                                    | 57,0  | 3,08 (1H, dt, 2,3, 13,3)                                    |
|                       |  | 7          | 44,7    1,88 (1H, m)  | 44,7  | 1,87 (1H, m)  |
|                       |  | 8          | 56,4  | 56,4  |   |
|                       |  | 9          | 37,9    a 2,32 (1H, m)<br>b 2,51 (1H, dt, 2,7, -13,7)               | 38,0    a 2,31 (1H, m)<br>b 2,50 (1H, dt, 2,7, -13,9) |   |
|                       |  | 10         | 198,5   | 198,5   |   |
|                       |  | 11         | 55,4    1,99 (1H, dd, 7,4, 13,7)                                    | 55,4  | 1,98 (1H, m)  |
|                       |  | 12         | 70,8  | 70,7  |   |
|                       |  | 13         | 26,9    1,35 (3H, s)  | 26,8  | 1,35 (3H, s)  |
|                       |  | 14         | 32,8    1,28 (3H, s)  | 32,8  | 1,28 (3H, s)  |
|                       |  | 15         | 23,6    1,38 (3H, s)  | 23,6  | 1,37 (3H, s)  |
|                       |  | 16         | 23,7    1,37 (3H, s)  | 23,7  | 1,38 (3H, s)  |
| Acyl-Seitenkette      |  | 1'         | 209,5   | 209,0   |   |
|                       |  | 2'         | 42,4    2,20 (1H, sept, 6,0)  | 49,1  | 1,92 (1H, ddd, 2,7, 6,6, 9,5)                               |
|                       |  | 3'         | 20,7    1,15 (3H, d, 6,5)   | 26,8  | a 1,32 (1H, m)<br>b 1,98 (1H, m)                            |
|                       |  | 4'         | 20,7    1,17 (3H, d, 6,5)   | 11,6  | 0,85 (3H, t, 7,4)   |
|                       |  | 5'         |   | 16,8  | 1,14 (3H, d, 6,5)   |
| Isopren I             |  | 1''        | 27,6    2,47 (2H, d, 7,3)   | 27,7  | 2,47 (2H, d, 7,3)   |
|                       |  | 2''        | 118,1    5,16 (1H, t, 7,1)  | 118,2   | 5,15 (1H, t, 7,2)   |
|                       |  | 3''        | 135,4   | 135,4   |   |
|                       |  | 4''        | 18,0    1,66 (3H, s)  | 18,0  | 1,66 (3H, s)  |
|                       |  | 5''        | 26,0    1,71 (3H, s)  | 26,0  | 1,71 (3H, s)  |
| Isopren II            |  | 1'''       | 22,8    a 1,81 (1H, dd, 3,5, -13,9)<br>b 2,63 (1H, dd, 10,0, -13,9) | 22,8  | a 1,81 (1H, dd, 3,9, -13,8)<br>b 2,65 (1H, dd, 10,0, -14,0) |
|                       |  | 2'''       | 47,6    2,61 (1H, m)  | 47,6  | 2,60 (1H, m)  |
|                       |  | 3'''       | 75,3  | 75,3  |   |
|                       |  | 4'''       | 25,7    1,36 (3H, s)  | 25,7  | 1,36 (3H, s)  |
|                       |  | 5'''       | 33,5    1,36 (3H, s)  | 33,4  | 1,36 (3H, s)  |



### Substanz 8

Die Summenformel  $C_{30}H_{44}O_6$  für Substanz **8** wurde mithilfe von ESI-HRMS festgelegt, welche ein Pseudomolekülion mit  $m/z$  523,3036  $[M+Na]^+$  (berechnet 523,3036) ergab. Die 30 Kohlenstoffatome teilen sich nach Auswertung der HSQC-Daten in elf quartäre, sechs Methin-, drei Methylen- und zehn Methylgruppen auf.

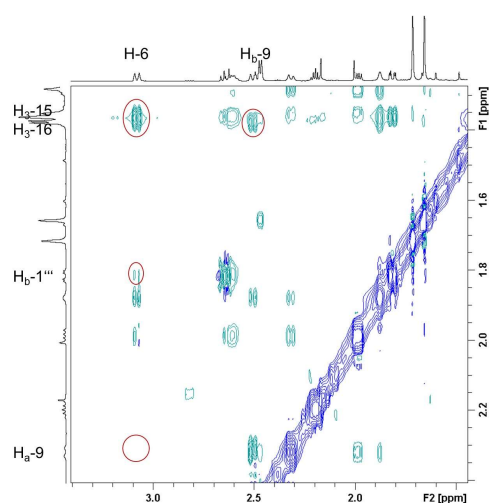
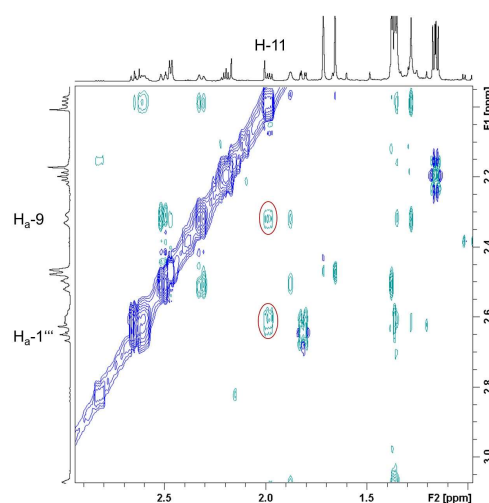
Zu den allgemeinen Strukturmerkmalen gehört ein fünfgliedriger Ring, der C-5, C-6, C-11, C-2''' und C-1''' beinhaltet. Dieser wurde zum einen durch eine lange Protonenkette im COSY-Spektrum ( $H_2$ -9 ( $\delta_H$  2,32 und 2,51 ppm)-H-7 ( $\delta_H$  1,88 ppm)-H-6 ( $\delta_H$  3,08 ppm)-H-11 ( $\delta_H$  1,99 ppm)-H-2''' ( $\delta_H$  2,61 ppm)- $H_2$ -1''' ( $\delta_H$  1,81 und 2,63 ppm)) belegt (**Abbildung 87**), zum anderen durch zahlreiche HMBC-Korrelationen von  $H_2$ -1''' zu C-4 ( $\delta_C$  201,1 ppm), C-5 ( $\delta_C$  73,6 ppm), C-6 ( $\delta_C$  57,0 ppm), C-10 ( $\delta_C$  198,5 ppm), C-11 ( $\delta_C$  55,4 ppm), C-2''' ( $\delta_C$  47,6 ppm) und C-3''' ( $\delta_C$  75,3 ppm), von H-2''' und C-5, C-6, C-11, C-1''' ( $\delta_C$  22,8 ppm), C-3''', C-4''' ( $\delta_C$  25,7 ppm) und C-5''' ( $\delta_C$  33,5 ppm) und außerdem von H-11 zu C-5, C-6, C-7 ( $\delta_C$  44,7 ppm), C-12 ( $\delta_C$  70,8 ppm), C-13 ( $\delta_C$  32,8 ppm), C-14 ( $\delta_C$  26,9 ppm), C-2''' und C-3''' bestätigt.



**Abbildung 87** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **8** mit Kreuzsignalen der Protonenkette  $H_2$ -9-H-7-H-6-H-11-H-2'''- $H_2$ -1'''

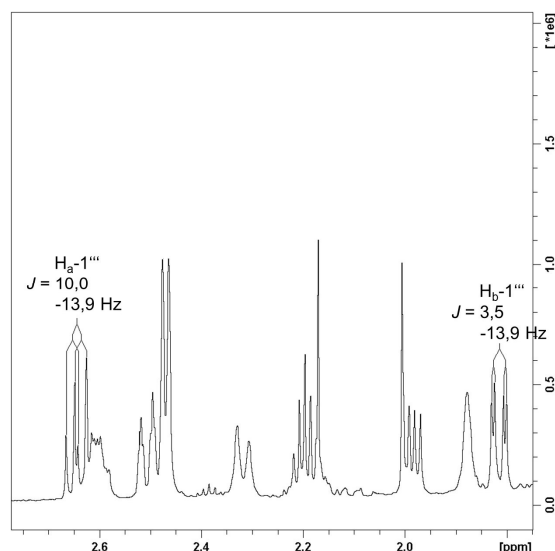
Im Übrigen wiesen Kreuzsignale der beiden geminalen Methylgruppen  $H_3$ -13 ( $\delta_H$  1,35 ppm) und  $H_3$ -14 ( $\delta_H$  1,28 ppm) zu C-11 und C-12 sowie  $H_3$ -4''' ( $\delta_H$  1,36 ppm) und  $H_3$ -5''' ( $\delta_H$  1,36 ppm) zu C-2''' und C-3''', zusammen mit den charakteristischen Verschiebungen der quartären Kohlenstoffatome C-12 und C-3''' auf zwei 2-Hydroxyisopropyl-Einheiten hin, die an C-11 und C-2''' lokalisiert sind.

Die relative Konfiguration von vier der sieben Stereozentren (C-1, C-3, C-5 und C-7) wird durch die Starrheit des trizyklischen Grundgerüsts festgelegt. Die  $\alpha$ -Orientierung des Protons an C-6 wurde durch Signale zwischen H-6 und H<sub>3</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  1,37 ppm) sowie H<sub>b</sub>-1'''' ( $\delta_{\text{H}}$  1,81 ppm), zwischen H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,38 ppm) und H<sub>b</sub>-9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,51 ppm) und das fehlende Signal zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,32 ppm) im NOESY-Spektrum abgeleitet (**Abbildung 88, a**). NOE-Korrelationen von H-11 zu H<sub>a</sub>-9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,32 ppm) und H<sub>a</sub>-1'''' ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 ppm) zeigten die  $\beta$ -Position des Protons H-11 an (**Abbildung 88, b**). Durch die Korrelationen wurde zusätzlich klar, dass es sich bei H<sub>b</sub>-1'''' um das  $\alpha$ -orientierte und bei H<sub>a</sub>-1'''' um das  $\beta$ -orientierte Proton der Methylengruppe H<sub>2</sub>-1'''' handelt.

**a****b**

**Abbildung 88** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **8** mit Kreuzsignalen von H<sub>3</sub>-15 und H<sub>b</sub>-9 und von H-6 und sowohl H<sub>3</sub>-16 als auch H<sub>b</sub>-1'''' sowie dem fehlenden Signal zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-9 (**a**) und von H-11 zu H<sub>a</sub>-9 und H<sub>a</sub>-1'''' (**b**)

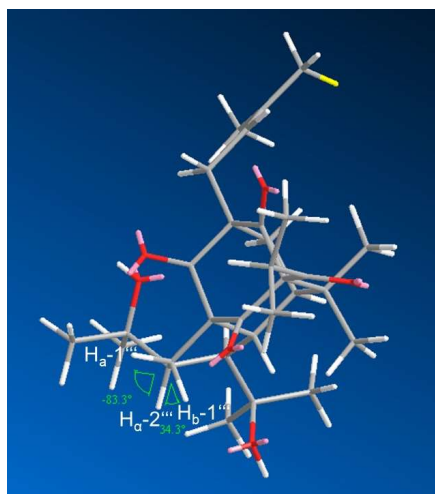
Zur Annahme, dass das H-Atom an C-2'''' ebenfalls  $\beta$ -orientiert war, führte zum einen das Fehlen eines NOESY-Signals zwischen H-2'''' und H-6, welches im Falle einer  $\alpha$ -Orientierung aufgrund der Entfernung der Protonen von nur 3 Å erwartet werden kann, zum anderen die Auswertung der Kopplungskonstanten und das Ausmessen der Diederwinkel zwischen den Protonen an C-1'''' und dem benachbarten Proton H-2'''. Das Signal für das  $\alpha$ -orientierte Proton H<sub>b</sub>-1'''' wurde im <sup>1</sup>H-Spektrum als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von 3,5 und -13,9 Hz aufgespalten. Das geminale H-Atom H<sub>a</sub>-1'''' erschien ebenfalls als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von 10,0 und -13,9 Hz (**Abbildung 89**). Dabei entsprechen die -13,9 Hz der Kopplungskonstante zwischen den beiden geminalen H-Atomen an C-1''''.



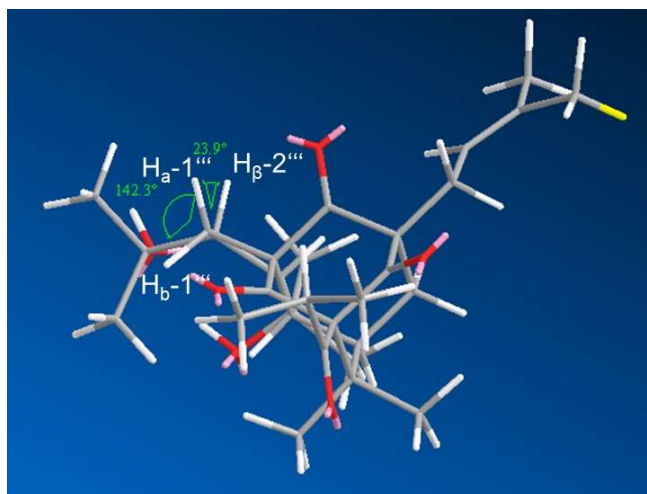
**Abbildung 89** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **8** mit dem Aufspaltungsmuster für die Protonen  $H_a-1'''$  und  $H_b-1'''$  und zugehörigen Kopplungskonstanten  $J$

Mithilfe des Programms ChemBio3D Ultra wurde das Molekül mit beiden möglichen Positionen für  $H-2'''$  simuliert und die Winkel zu den beiden vicinalen Protonen ausgemessen (**Abbildung 90**). Anschließend wurde anhand der Karplus-Kurve auf die entsprechende Kopplungskonstante geschlossen und diese mit den Messdaten verglichen. Ist  $H-2'''$  in  $\alpha$ -Position, so beträgt der Winkel zum  $\alpha$ -Proton  $H_b-1'''$   $\sim 30^\circ$ , zum  $\beta$ -Proton  $H_a-1'''$   $\sim 80^\circ$ . Entsprechend der Karplus-Kurve würde dies zu einer sehr großen Kopplungskonstante zwischen  $H-2'''$  und  $H_b-1'''$  und einer relativ kleinen zwischen  $H-2'''$  und  $H_a-1'''$  führen. Im umgekehrten Fall würden die Diederwinkel etwa  $140^\circ$  bzw.  $20^\circ$  ausmachen, was einer kleinen bzw. einer relativ großen Kopplungskonstante entspricht.

a



b



**Abbildung 90** Dreidimensionales Modell der Struktur von **8** mit  $\alpha$ - (a) bzw.  $\beta$ -Orientierung (b) des Protons H-2''' und gemessenen Diederwinkeln (grün) zwischen H-2''' und H<sub>a</sub>-1''' bzw. H<sub>b</sub>-1'''; in grau ist das Kohlenstoffgrundgerüst dargestellt, weiß entspricht jeweils einem Proton, rot jeweils einem Sauerstoffatom und pink sind die freien Elektronenpaare

Der Vergleich mit den Messdaten macht deutlich, dass es sich bei der zweiten Möglichkeit um die vorliegende Struktur handelt und bestätigt damit die Vermutung der  $\beta$ -Orientierung für das Proton H-2'''. Somit ergeben sich für die zahlreichen Stereozentren des Moleküls die relativen Konfigurationen 1*R*\*, 3*S*\*, 5*R*\*, 6*R*\*, 7*R*\*, 11*R*\* und 2'''*S*\*.

Substanz **8** wird bestimmt als (1*R*\*, 2*S*\*, 3*aR*\*, 5*S*\*, 7*R*\*, 9*R*\*, 9*aR*\*)-1,2-bis(2-Hydroxypropan-2-yl)-7-isobutyryl-8,8-dimethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)hexahydro-3*a*,7:5,9-dimethanocyclopenta[8]annulen-4,6,11(1*H*,5*H*)-trion. Der in der Literatur bisher nicht beschriebene Naturstoff wird **Hyperihirsolin A** genannt.

### Substanz 9

Zur Berechnung der Summenformel C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>6</sub> für Substanz **9** wurde das mittels ESI-HRMS gefundene Pseudomolekülion mit *m/z* 537,3188 [M+Na]<sup>+</sup> (berechnet 537,3187) herangezogen.

Hohe Übereinstimmung der NMR-Daten von **8** und **9** und der Unterschied von 14 Masseinheiten führten zur Vermutung, dass es sich bei **9** um das 2-Methylbutyryl-Analogon zu **8** handelt. Durch

Auswertung der  $^1\text{H}$ - und HMBC-NMR-Spektren konnte diese Annahme bestätigt werden. Die relative Stereochemie konnte entsprechend der Argumentation für **8** gleichermaßen beschrieben werden.

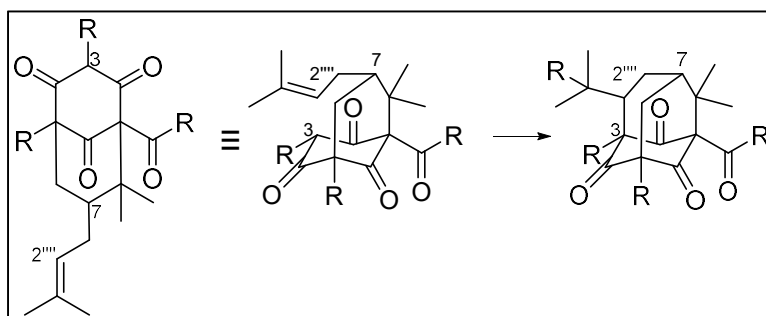
Konsequenterweise erhält die bislang unbekannte Verbindung den Trivialnamen **Hyperihirsolin B** und kann als (1*R*\*,2*S*\*,3*aR*\*,5*S*\*,7*R*\*,9*R*\*,9*aR*\*)-1,2-bis(2-Hydroxypropan-2-yl)-8,8-dimethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)hexahydro-3*a*,7:5,9-dimethanocyclopenta[8]annulen-4,6,11(1*H*,5*H*)-trion beschrieben werden.

Es wurde bislang erst eine Substanz, das **Hyperisampsin A**, mit einem vergleichbaren Grundgerüst in der Gattung *Hypericum* gefunden. Diese Verbindung weist auch einen zusätzlichen Ring, der C-5, C-6, C-11, C-1''' und C-2''' umfasst und mit zwei 2-Hydroxyisopropyl-Einheiten substituiert ist auf, besitzt allerdings einen aromatischen Acylrest und eine Geranylseitenkette an C-3. Isoliert wurde die Substanz aus *H. sampsonii*, einer Art aus der Sektion 9c *Sampsonia* (Zhu et al. 2014). Daneben wurde die verwandte Substanz, **Hyperisampsin B** gefunden, bei der die 2-Hydroxyisopropyl-Einheit an C-2''' allerdings zur Isopropylfunktion reduziert ist. Aus *Garcinia multiflora* wurde das **Garcimultifloron O** isoliert, das sich ebenfalls in der Acylfunktion und dem Substituenten an C-3 von den hier beschriebenen Substanzen unterscheidet (Wang et al. 2018).

### 2.3.4 Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ

Der größten Gruppe der in dieser Arbeit gefundenen Substanzen liegt ein Tricyclo[4.3.1.1<sup>3,7</sup>]undecan-Körper, auch als Homoadamantan bekannt, zugrunde.

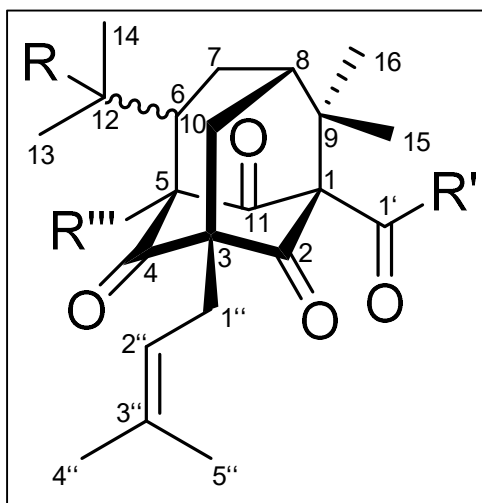
Wie der Adamantan-Grundkörper bildet sich dieser ausgehend von einem Acylphloroglucinol vom Typ A mit einer Prenylierung an C-7. Allerdings kommt es in diesem Fall zum Ringschluss zwischen C-3 des Grundkörpers und C-2''' der Prenyleinheit.



**Abbildung 91** Bildung des Homoadamantan-Grundgerüsts ausgehend von einem bicyklischen, polyprenylierten Acylphloroglucinol vom Typ A

#### 2.3.4.1 Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts

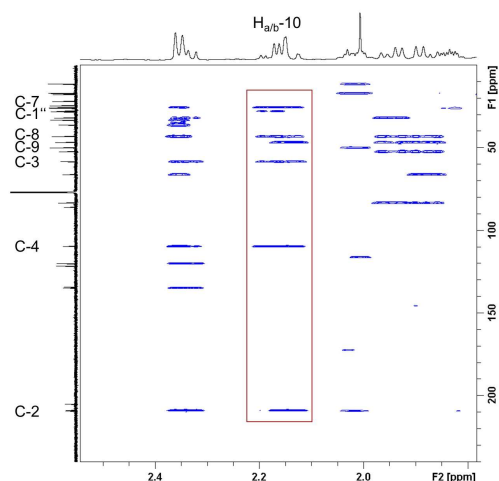
Entsprechend der Annahme, dass es sich beim Homoadamantan-Typ um ein polyprenyliertes, polyzyklisches Acylphloroglucinol handelt, ergibt sich zusätzlich eine Isopropyl-Einheit an C-6 und zwei Methylgruppen an C-9. Außerdem kann wie bereits beschrieben in allen Substanzen ein Acylrest in Position 1 und eine weitere Isoprensubstitution in Position 3 ausgemacht werden, so dass sich für die isolierten Strukturen **10** bis **25** folgendes Grundgerüst ergibt:



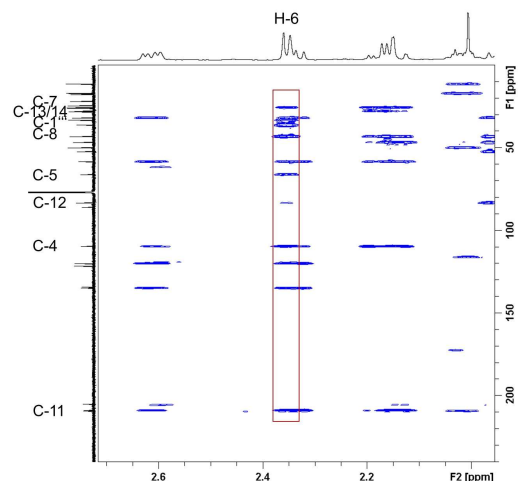
**Abbildung 92** Grundkörper der Substanzen **10** bis **25**: Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ

Erschwerend auf die Aufklärung der polyprenylierten Substanzen wirkt sich abermals die Vielzahl an quartären Kohlenstoffatomen aus. Charakteristisch für die komplexe, polyzyklische Struktur waren jedoch wieder zahlreiche HMBC-Korrelationen. Vor allem ausgehend von der Methylen-Gruppe an Position 10 und dem Wasserstoffatom H-6 wurden sehr viele Kreuzsignale detektiert: H<sub>2</sub>-10 zu C-2, C-3, C-4, C-7, C-8, C-9 und C-1'' und H-6 zu C-4, C-5, C-7, C-8, C-11, C-12, C-13, C-14 und C-1''' (**Abbildung 93, a und b**).

**a**

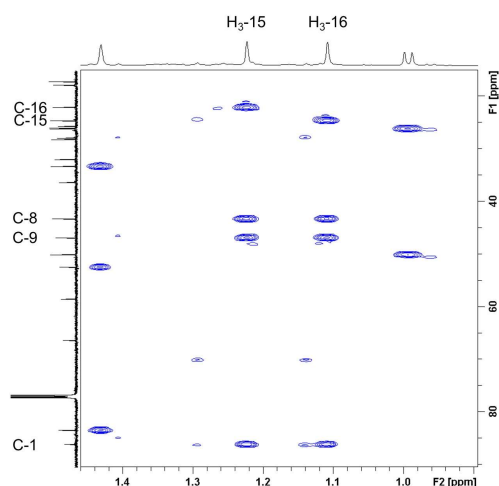
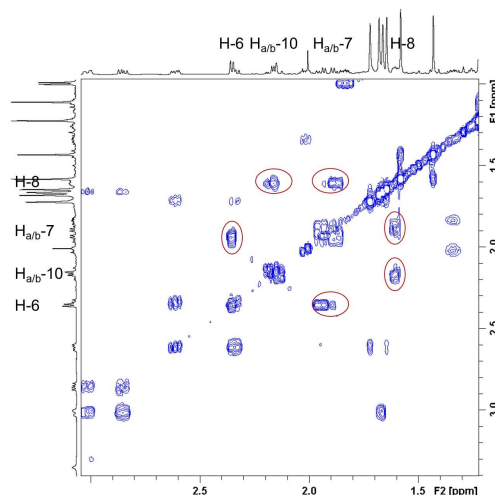


**b**



**Abbildung 93** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **14** mit Korrelationen der Protonen H<sub>2</sub>-10 und C-2, C-3, C-4, C-7, C-8, C-9 und C-1'' (**a**) sowie des Wasserstoffatoms H-6 und C-4, C-5, C-7, C-8, C-11, C-12, C-13, C-14 und C-1''' (**b**)

Zusammen mit den HMBC-Signalen der geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-15 und H<sub>3</sub>-16 zu C-1, C-8, C-9 und C-15 oder C-16 und der Wasserstoffkette H<sub>2</sub>-10-H-8-H<sub>2</sub>-7-H-6, die über das COSY-Experiment ermittelt wurde, konnte das Homoadamantan als Grundgerüst angenommen werden (**Abbildung 94, a und b**).

**a****b**

**Abbildung 94** Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **14** mit Korrelationen der beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-15 und H<sub>3</sub>-16 und C-1, C-8, C-9 und C-15 oder C-16 (**a**) und Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **14** mit Kreuzsignalen zwischen den Protonen H<sub>2</sub>-10-H-8-H<sub>2</sub>-7-H-6 (**b**)

HMBC-Signale des zweiten geminalen Methylpaares H<sub>3</sub>-13 und H<sub>3</sub>-14 zu den Kohlenstoffatomen C-6, C-12 und entweder zu C-13 oder C-14 manifestierten die Positionierung der Isopropyl-Einheit.

Die relative Konfiguration an den vier Chiralitätszentren C-1, C-3, C-5 und C-8 wird durch die starre Würfelstruktur des Gerüsts selbst bestimmt. Die restlichen Stereozentren wurden durch sorgfältige Auswertung der NOESY-Daten und mithilfe von Literaturangaben ermittelt.



## 2.3.4.2 Substanzen 10, 11, 12 und 13

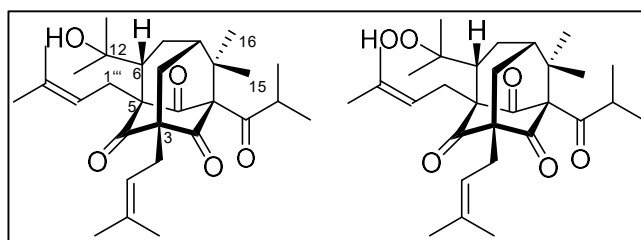


Abbildung 95 Strukturformeln der isolierten Substanzen 10 und 11

Tabelle 44  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 10 und 11; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

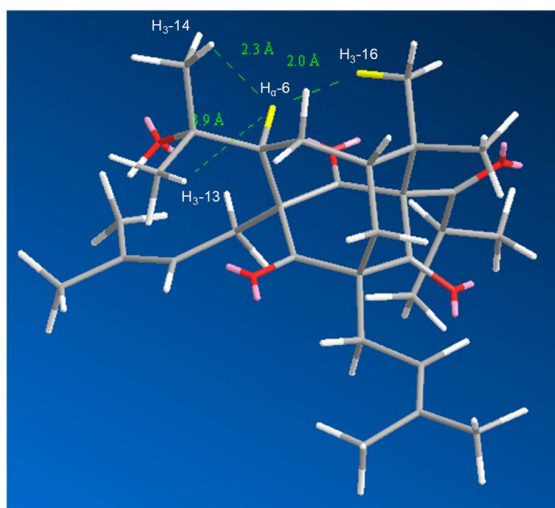
|                           | C/H  | Substanz 10         |   | Substanz 11         |   |
|---------------------------|------|---------------------|---|---------------------|---|
|                           |      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                 | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                       |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1    | 87,3                |   | 87,3                |   |
|                           | 2    | 205,2               |   | 205,1               |   |
|                           | 3    | 67,8                |   | 67,7                |   |
|                           | 4    | 208,2               |   | 208,1               |   |
|                           | 5    | 70,9                |   | 70,2                |   |
|                           | 6    | 49,4                | 1,83 (1H, m)  | 43,4                | 2,38 (1H, dd, 9,2, 10,6)                                    |
|                           | 7    | 29,4                | a 1,84 (1H, m)<br>b 1,90 (1H, m)                      | 28,6                | 1,84 (2H, m)  |
|                           | 8    | 43,4                | 1,89 (1H, m)  | 43,2                | 1,42 (1H, m)  |
|                           | 9    | 47,4                |   | 47,2                |   |
|                           | 10   | 38,0                | a 1,79 (1H, pd, -14,3)<br>b 2,51 (1H, dd, 6,0, -14,2) | 37,0                | a 1,84 (1H, m)<br>b 2,53 (1H, dd, 6,6, -14,3)               |
|                           | 11   | 206,2               |   | 205,3               |   |
|                           | 12   | 75,9                |   | 87,3                |   |
|                           | 13   | 26,8                | 1,40 (3H, s)  | 21,7                | 1,43 (3H, s)  |
|                           | 14   | 33,0                | 1,34 (3H, s)  | 26,7                | 1,31 (3H, s)  |
|                           | 15   | 24,8                | 1,25 (3H, s)  | 24,8                | 1,25 (3H, s)  |
|                           | 16   | 22,5                | 1,25 (3H, s)  | 22,5                | 1,24 (3H, s)  |
| Acyl-Seitenkette          | 1'   | 209,0               |   | 209,1               |   |
|                           | 2'   | 43,0                | 2,04 (1H, sept, 6,5)                                  | 43,0                | 2,03 (1H, sept, 6,1)  |
|                           | 3'   | 20,7                | 1,13 (3H, d, 6,5)                                     | 20,7                | 1,13 (3H, d, 6,4)   |
|                           | 4'   | 21,7                | 1,01 (3H, d, 6,5)                                     | 21,7                | 1,00 (3H, d, 6,5)   |
| Isopren I                 | 1''  | 28,7                | 2,55 (2H, m)  | 28,6                | 2,56 (2H, d, 7,4)   |
|                           | 2''  | 119,0               | 5,21 (1H, t, 7,3)                                     | 119,0               | 5,23 (1H, t, 7,3)   |
|                           | 3''  | 135,2               |   | 135,3               |   |
|                           | 4''  | 18,0                | 1,68 (3H, s)  | 18,0                | 1,68 (3H, s)  |
|                           | 5''  | 26,0                | 1,72 (3H, s)  | 26,0                | 1,72 (3H, s)  |
| Isopren II                | 1''' | 34,1                | 3,19 (2H, m)  | 32,4                | a 3,06 (1H, dd, 3,6, -14,5)<br>b 3,21 (1H, dd, 10,3, -13,8) |
|                           | 2''' | 119,9               | 4,51 (1H, m)  | 120,1               | 4,50 (1H, m)  |
|                           | 3''' | 136,7               |   | 136,6               |   |
|                           | 4''' | 18,1                | 1,61 (3H, s)  | 18,2                | 1,61 (3H, s)  |
|                           | 5''' | 25,7                | 1,50 (3H, s)  | 25,7                | 1,50 (3H, s)  |

*Substanz 10*

Das ESI-HRMS-Spektrum für **10** ergab im positiven Modus ein pseudomolekulares Ion bei  $m/z$  485,3266  $[M+H]^+$  (berechnet 485,3262), übereinstimmend mit der Summenformel  $C_{30}H_{44}O_5$ . Im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum wurden 30 Kohlenstoffatome detektiert, die per HSQC als elf quartäre, fünf Methin-, vier Methylen- und zehn Methyl-C-Atome beschrieben werden können.

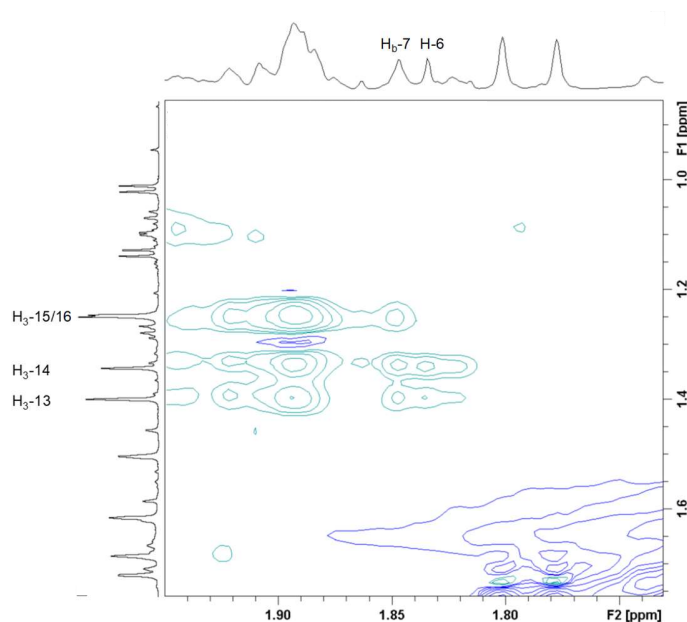
Neben den bereits bekannten Strukturelementen wie dem Homoadamantan-Grundgerüst, dem Acylrest und einer Isopreneinheit in Position 3, deutete das  $^1H$ -NMR-Spektrum durch ein Signal bei  $\delta_H$  4,51 ppm auf einen weiteren Isoprenrest hin. Bestätigt wurde diese Vermutung durch HMBC-Korrelationen zur Methylengruppe C-1''' ( $\delta_C$  34,1 ppm) und den beiden geminalen Methylgruppen C-4''' ( $\delta_C$  18,1 ppm) und C-5''' ( $\delta_C$  25,7 ppm). Anhand von HMBC-Kreuzsignalen zwischen H<sub>2</sub>-1''' ( $\delta_H$  3,19 ppm) und C-4 ( $\delta_C$  208,2 ppm), C-5 ( $\delta_C$  70,9 ppm), C-6 ( $\delta_C$  49,4 ppm) und auch C-11 ( $\delta_C$  206,2 ppm) kristallisierte sich C-5 als Substitutionsstelle heraus. Die tieffeldverschobene Position des quartären C-Atoms C-12 ( $\delta_C$  75,9 ppm) deutete zusammen mit der Summenformel auf eine Hydroxygruppe hin.

Die relative Konfiguration des Protons H-6 ( $\delta_H$  1,83 ppm) war aufgrund der sehr ähnlichen Verschiebungen der umliegenden Protonen H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_H$  1,84 und 1,91 ppm), H-8 ( $\delta_H$  1,89 ppm) und H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_H$  1,79 ppm) schwer zu bestimmen. Ist das H-Atom  $\alpha$ -ständig, so ergibt eine Simulierung der Struktur mit Hilfe der Chem3D Software und einer Energieoptimierung mittels MM2-Algorithmus einen Abstand von nur 2,0 Å für H <sub>$\alpha$</sub> -6 und H<sub>3</sub>-16 (**Abbildung 96**).



**Abbildung 96** Dreidimensionales Modell der Struktur von **10** mit den gemessenen Abständen (grün) zwischen dem Proton H <sub>$\alpha$</sub> -6 und den Methylgruppen H<sub>3</sub>-13, H<sub>3</sub>-14 und H<sub>3</sub>-16, in grau ist das Kohlenstoffgrundgerüst dargestellt, weiß entspricht jeweils einem Proton, rot jeweils einem Sauerstoffatom und pink sind die freien Elektronenpaare

Die räumliche Nähe müsste sich durch ein deutliches Kreuzsignal zwischen diesen Protonen im NOE-Experiment äußern, welches in diesem Fall allerdings nicht zu detektieren ist (**Abbildung 97**). Aus diesem Grund wurde von einer  $\beta$ -Stellung für das Proton ausgegangen. Eine NOE-Interaktion zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-10, die die gleichgerichtete Positionierung untermauern würde, konnte wie bereits erwähnt aufgrund der nahezu identischen Verschiebung der Protonen nicht ermittelt werden.



**Abbildung 97** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **10** mit Kreuzsignalen zwischen H-6 und H<sub>3</sub>-13 und H<sub>3</sub>-14 sowie fehlendem Signal zu H<sub>3</sub>-16

Bei der Verbindung handelt es sich daher um (1*S*<sup>\*</sup>,3*R*<sup>\*</sup>,4*R*<sup>\*</sup>,6*S*<sup>\*</sup>,8*R*<sup>\*</sup>)-4-(2-Hydroxypropan-2-yl)-8-isobutyryl-7,7-dimethyl-1,3-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)tricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecan-2,9,11-trion, welche den Trivialnamen **Hirsutofolin A** erhält.

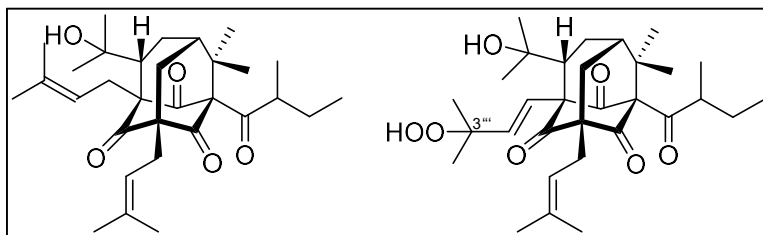
**Substanz 11**

Substanz **11** zeigt im ESI-HRMS-Spektrum ein positives Ion mit der Masse  $m/z$  501,3220  $[M+H]^+$  (berechnet 501,3211), welches der Summenformel  $C_{30}H_{44}O_6$  entspricht.

Die 1D- und 2D-NMR-Daten von **11** stimmten bis auf wenige Ausnahmen mit denen von **10** überein. Im  $^{13}C$ -Spektrum ist lediglich das quartäre Kohlenstoffatom C-12 ( $\delta_C$  87,3 ppm) im Vergleich zu  $\delta_C$  75,9 ppm (C-12 in **10**) stärker tieffeldverschoben, wohingegen die Kohlenstoffatome C-6, C-13 und C-14 eine Verschiebung ins Hochfeld aufweisen ( $\delta_C$  43,4, 21,7 und 26,7 ppm in **11** und  $\delta_C$  49,4, 26,8 und 33,0 ppm in **10**). Diese Änderungen der Verschiebungen ließen zusammen mit dem zusätzlichen Sauerstoffatom in der Summenformel vermuten, dass die Hydroxygruppe an C-12 durch ein Peroxid ersetzt ist. Der Einfluss einer Peroxy- anstelle einer Hydroxygruppe zeigt sich an den beiden Substanzen **Peroxsampson A** und **Plukenetion C** (Xiao et al. 2010).

Aufgrund der stärkeren Entschirmung von H-6 ( $\delta_H$  2,38 ppm, anstelle von 1,83 ppm in **10**) waren die NOE-Korrelationen eindeutiger zu interpretieren. Signale von H<sub>b</sub>-10 ( $\delta_H$  2,53 ppm) zu H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_H$  1,25 ppm), von H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_H$  1,84 ppm) zu H-6 ( $\delta_H$  2,38 ppm) und das fehlende Signal von H-6 zu H<sub>3</sub>-16 ( $\delta_H$  1,24 ppm) legten die relative  $\beta$ -Konfiguration von H-6 fest.

Die neue Verbindung konnte als (1*S*\*,3*R*\*,4*R*\*,6*S*\*,8*R*\*)-4-(2-Hydroperoxypropan-2-yl)-8-isobutyryl-7,7-dimethyl-1,3-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)tricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecane-2,9,11-trion identifiziert werden und erhält entsprechend **10** den Trivialnamen **Peroxyhirsutofolin A**.

Abbildung 98 Strukturformeln der isolierten Substanzen **12** und **13**Tabelle 45  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen **12** und **13**; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                           | C/H  | Substanz 12         |  | Substanz 13         |                                       |
|---------------------------|------|---------------------|--|---------------------|---------------------------------------|
|                           |      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                                  | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1    | 87,5                |  | 86,0                |                                       |
|                           | 2    | 205,3               |  | 204,1               |                                       |
|                           | 3    | 67,9                |  | 67,5                |                                       |
|                           | 4    | 208,3               |  | 204,5               |                                       |
|                           | 5    | 70,9                |  | 68,1                |                                       |
|                           | 6    | 49,5                | 1,84 (1H, m)   | 52,0                | 2,09 (1H, dd, 7,6, 11,3)              |
|                           | 7    | 29,5                | 1,88 (2H, m)   | 29,3                | 1,87 (2H, m)                          |
|                           | 8    | 43,4                | 1,88 (1H, m)   | 42,8                | 1,93 (1H, t, 6,7)                     |
|                           | 9    | 47,6                |  | 47,3                |                                       |
|                           | 10   | 38,4                | a 1,79 (1H, d, -14,3)<br>b 2,49 (1H, dd, 5,9, -14,4)                   | 35,8                | a 1,87 (1H, m)<br>b 2,52 (1H, m)      |
|                           | 11   | 206,0               |  | 201,3               |                                       |
|                           | 12   | 75,9                |  | 76,4                |                                       |
|                           | 13   | 26,6                | 1,39 (3H, s)   | 24,0                | 1,39 (3H, s)                          |
|                           | 14   | 33,0                | 1,32 (3H, s)   | 32,7                | 1,26 (3H, s)                          |
|                           | 15   | 24,7                | 1,22 (3H, s)   | 24,6                | 1,26 (3H, s)                          |
|                           | 16   | 22,7                | 1,26 (3H, s)   | 21,9                | 1,26 (3H, s)                          |
| Acy-Seitenkette           | 1'   | 208,5               |  | 207,0               |                                       |
|                           | 2'   | 50,1                | 1,70 (1H, m)   | 50,8                | 1,63 (1H, m)                          |
|                           | 3'   | 26,6                | a 1,30 (1H, ddd, 2,8, 7,1, -14,0)<br>b 1,98 (1H, ddd, 2,0, 7,3, -13,8) | 26,2                | a 1,33 (1H, m)<br>b 1,87 (1H, m)      |
|                           | 4'   | 11,6                | 0,80 (3H, t, 7,5)  | 11,6                | 0,78 (3H, t, 7,4)                     |
|                           | 5'   | 17,7                | 1,00 (3H, d, 6,5)  | 16,8                | 1,08 (3H, d, 6,5)                     |
| Isopren I                 | 1''  | 28,9                | 2,53 (2H, dd, 1,9, 6,8)  | 28,5                | 2,54 (2H, m)                          |
|                           | 2''  | 119,1               | 5,17 (1H, t, 7,2)  | 118,6               | 5,24 (1H, t, 7,3)                     |
|                           | 3''  | 135,0               |  | 135,8               |                                       |
|                           | 4''  | 18,0                | 1,68 (3H, s)   | 18,1                | 1,66 (3H, s)                          |
|                           | 5''  | 26,1                | 1,70 (3H, s)   | 26,1                | 1,73 (3H, s)                          |
| Isopren II                | 1''' | 34,1                | 3,17 (2H, d, 8,0)  | 127,1               | 6,68 (1H, d, 16,6)                    |
|                           | 2''' | 119,7               | 4,50 (1H, t, 7,2)  | 134,1               | 5,72 (1H, d, 16,6)                    |
|                           | 3''' | 136,2               |  | 82,0                |                                       |
|                           | 4''' | 18,1                | 1,61 (3H, s)   | 24,9                | 1,26 (3H, s)                          |
|                           | 5''' | 26,0                | 1,51 (3H, s)   | 25,1                | 1,30 (3H, s)                          |

### Substanz 12

Das ESI-HR-Massenspektrum von **12** ergab ein pseudomolekulares, positives Ion mit  $m/z$  499,3424  $[M+H]^+$  (berechnet 499,3418), was zur Berechnung der Summenformel  $C_{31}H_{46}O_5$  führte.

Abermals ähnelten die NMR-Spektren sehr denen von **10**. Im  $^{13}C$ -Spektrum konnte ein zusätzliches Kohlenstoffatom ausgemacht werden, das sich im HSQC-Spektrum als sekundäres C-Atom ( $\delta_C$  26,6 ppm;  $\delta_H$  1,30 und 1,98 ppm) entpuppte. Da die Protonen der Methylengruppe im HMBC-Spektrum mit C-1' ( $\delta_C$  208,5 ppm), C-2' ( $\delta_C$  50,1 ppm), C-4' ( $\delta_C$  11,6 ppm) und C-5' ( $\delta_C$  17,7 ppm) der Startersäure koppelten, konnte der Austausch der Isobutyryl-Einheit in Substanz **10** durch eine 2-Methylbutyryl-Einheit in **12** angenommen werden.

Die Position des Protons im Stereozentrum C-6 konnte analog der beiden vorhergehenden Substanzen als  $\beta$ -orientiert beschrieben werden.

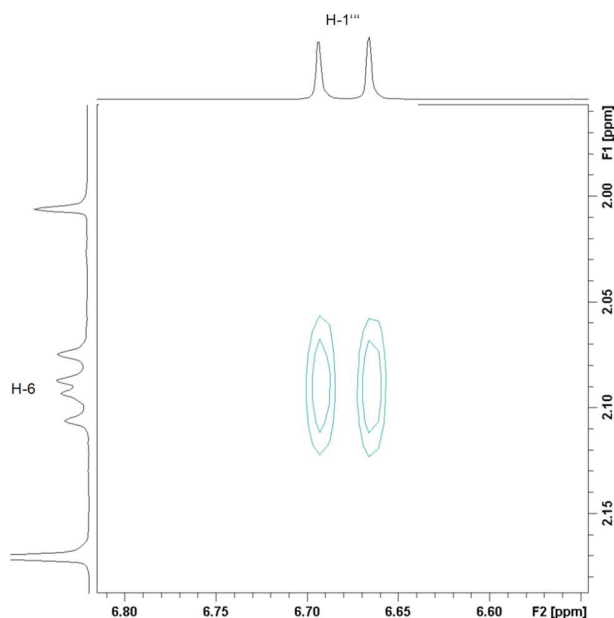
Somit handelt es sich bei der Verbindung um (1*S*\*,3*R*\*,4*R*\*,6*S*\*,8*R*\*)-4-(2-Hydroxypropan-2-yl)-7,7-dimethyl-1,3-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-8-(2-methylbutanoyl)tricyclo[4.3.1.<sup>1,3,8</sup>]undecan-2,9,11-trion, welches **Hirsutofolin B** genannt wird und einen bislang unbekannten Naturstoff darstellt.

### Substanz 13

Positive ESI-HRMS ermöglichte die Berechnung der Summenformel  $C_{31}H_{46}O_7$  aus dem Pseudomolekülion  $m/z$  553,3139  $[M+Na]^+$  (berechnet 553,3136) für Substanz **13**.

Die NMR-Daten von **13** weisen viele Übereinstimmungen mit denen von **12** auf. Erstmals waren im Protonenspektrum aber zwei deutlich tieffeldverschobene Dubletts  $\delta_H$  5,72 und 6,68 ppm ( $J$  16,6 Hz) zu erkennen, die jeweils einem H-Atom entsprachen. Zusätzlich wurde im  $^{13}C$ -Spektrum ein quartäres C-Atom  $\delta_C$  82,0 ppm detektiert. Die Auswertung der HMBC-Daten führte zur Schlussfolgerung, dass es sich bei **13** um das 3'''-Hydroperoxy-Derivat von **12** handelt, bei dem die Doppelbindung von C-2'''/C-3''' zu C-1'''/C-2''' gewandert ist. Die Größe der Kopplungskonstante ließ auf eine *trans*-konfigurierte Doppelbindung schließen (Bienz et al. 2016). Deutlich werden die Veränderungen durch Einführung einer Hydroperoxy-Gruppe auch beim Vergleich der NMR Daten von **Plukenetion C**, einem Inhaltsstoff aus *C. plukenetii* (Henry et al. 1999) und **33-Hydroperoxyisoplukenetion C**, welches aus *C. havetiodes* var. *stenocarpa* isoliert wurde (Christian et al. 2001).

Auch für **13** konnte eine  $\beta$ -Konfiguration des Protons H-6 angenommen werden, was unter anderem mit einer intensiven NOE-Korrelation zwischen H-6 und H-1''' zu begründen ist (**Abbildung 99**).



**Abbildung 99** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **13** mit Kreuzsignal zwischen H-6 und H-1'''

Somit kann die relative Stereochemie von **10** bis **13** als  $1R^*$ ,  $3S^*$ ,  $5R^*$ ,  $6R^*$ ,  $8S^*$  angegeben werden.

Der neue Naturstoff kann als  $(1S^*, 3R^*, 4R^*, 6S^*, 8R^*)$ -3-((*E*)-3-Hydroperoxy-3-methylbut-1-en-1-yl)-4-(2-hydroxypropan-2-yl)-7,7-dimethyl-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-8-(2-methylbutanoyl)tricyclo[4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecan-2,9,11-trion beschrieben werden und wird entsprechend **12** als **3'''-Hydroperoxyisohirsutofolin B** bezeichnet.

Strukturell vergleichbare, prenylierte Homoadamantan-Derivate konnten bereits aus *H. erectum* (Ishida et al. 2010), aus *C. obdeltifolia* (Cruz und Teixeira 2004) und aus *H. sampsonii* (Xiao et al. 2007; Zhu et al. 2016b) isoliert werden. Zwei Strukturen mit inverser Konfiguration an C-6, **Pseudohenon F** und **G**, wurden für *H. pseudohenryi* identifiziert (Yang et al. 2017a).

## 2.3.4.3 Substanzen 14, 15 und 16

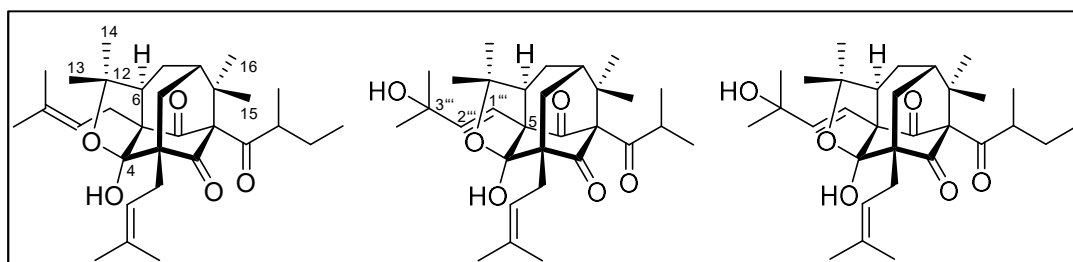


Abbildung 100 Strukturformeln der isolierten Substanzen 14, 15 und 16

Tabelle 46  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 14, 15 und 16; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                           | Substanz 14 |  | Substanz 15  |  | Substanz 16  |  |
|---------------------------|-------------|--|--|--|--|--|
|                           | C/H         | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1           | 86,0   | 85,0   | 84,9   | 84,9   |  |
|                           | 2           | 209,0  | 208,8  | 208,8  | 208,8  |  |
|                           | 3           | 58,5   | 58,4   | 58,4   | 58,4   |  |
|                           | 4           | 109,8  | 108,2  | 108,3  | 108,3  |  |
|                           | 5           | 66,3   | 67,4   | 67,5   | 67,5   |  |
|                           | 6           | 52,4   | 52,8   | 52,9   | 52,9   | 2,35 (1H, m)   |
|                           | 7           | 25,7   | 25,4   | 25,6   | 25,6   | a 1,88 (1H, dd, 8,5, -16,5)<br>b 1,94 (1H, dd, 7,6, -16,5)   |
|                           | 8           | 43,3   | 43,1   | 43,2   | 43,2   | 1,61 (1H, m)   |
|                           | 9           | 46,9   | 46,9   | 47,2   | 47,2   |  |
|                           | 10          | 32,0   | 32,6   | 32,5   | 32,5   | a 2,14 (1H, m)<br>b 2,18 (1H, m)                             |
|                           | 11          | 205,2  | 203,2  | 203,4  | 203,4  |  |
|                           | 12          | 83,4   | 84,0   | 84,1   | 84,1   |  |
|                           | 13          | 28,2   | 27,0   | 27,1   | 27,1   | 1,43 (3H, s)   |
|                           | 14          | 33,3   | 33,0   | 33,1   | 33,1   | 1,58 (3H, s)   |
|                           | 15          | 24,7   | 24,3   | 24,5   | 24,5   | 1,22 (3H, s)   |
|                           | 16          | 22,1   | 21,8   | 22,0   | 22,0   | 1,11 (3H, s)   |
| Acyl-Seitenkette          | 1'          | 209,3  | 208,4  | 208,2  | 208,2  |  |
|                           | 2'          | 50,1   | 43,2   | 49,8   | 49,8   | 1,83 (1H, ddd, 2,9, 6,6, 9,6)                                |
|                           | 3'          | 26,2   | 20,2   | 26,1   | 26,1   | a 1,33 (1H, m)<br>b 2,03 (1H, m)                             |
|                           | 4'          | 11,6   | 21,0   | 11,6   | 11,6   | 0,85 (3H, t, 7,5)  |
|                           | 5'          | 17,2   |  | 16,8   | 16,8   | 0,99 (3H, d, 6,5)  |
| Isopren I                 | 1''         | 27,9   | 28,4   | 28,3   | 28,3   | a 2,34 (1H, dd, 8,3, -14,9)<br>b 2,61 (1H, dd, 6,0, -14,2)   |
|                           | 2''         | 120,1  | 120,1  | 120,2  | 120,2  | 5,37 (1H, t, 7,7)  |
|                           | 3''         | 134,9  | 135,1  | 135,0  | 135,0  |  |
|                           | 4''         | 17,8   | 17,8   | 17,9   | 17,9   | 1,64 (3H, s)   |
|                           | 5''         | 26,0   | 26,1   | 26,0   | 26,0   | 1,72 (3H, s)   |
| Isopren II                | 1'''        | 36,4   | 125,7  | 125,9  | 125,9  | a 2,85 (1H, dd, 8,6, -14,9)<br>b 3,01 (1H, dd, 4,0, -15,1)   |
|                           | 2'''        | 121,6  | 143,6  | 143,5  | 143,5  | 5,35 (1H, t, 8,3)  |
|                           | 3'''        | 134,3  | 71,2   | 71,4   | 71,4   |  |
|                           | 4'''        | 17,9   | 29,4   | 29,5   | 29,5   | 1,68 (3H, s)   |
|                           | 5'''        | 26,2   | 29,9   | 29,9   | 29,9   | 1,66 (3H, s)   |



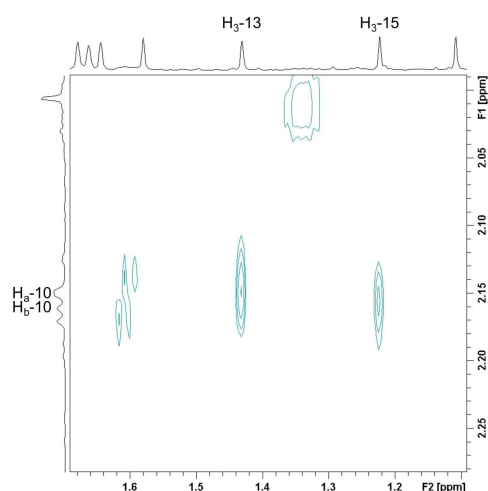
*Substanz 14*

Für **14** führte die ESI-HRMS zu einem pseudomolekularen Ion  $m/z$  499,3426  $[M+H]^+$  (berechnet 499,3418), woraus sich die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_5$  ergibt. Von den 31 Kohlenstoffatomen konnten mittels HSQC elf als quartär, fünf als tertiär, fünf als sekundär und zehn als primär identifiziert werden.

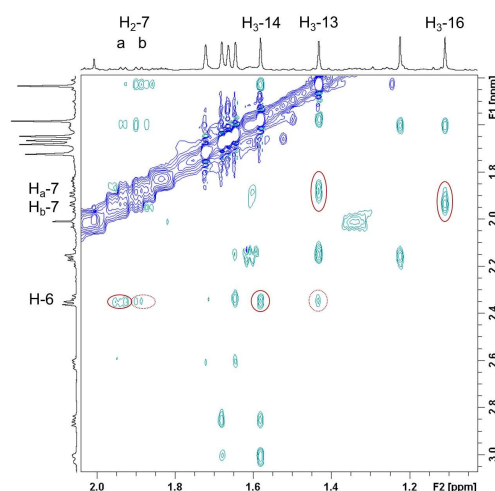
Aus der Interpretation der 1D- und 2D-NMR-Daten resultierten viele der bereits bekannten Strukturelemente: das Homoadamantan-Grundgerüst, der Acylrest als 2-Methylbutyryl-Einheit in Position 1 und zwei Isoprensubstituenten in den Positionen 3 und 5. Bislang unbekannt war das Auftreten von nur drei Carbonyl-Kohlenstoffatomen C-2 ( $\delta_C$  209,0 ppm), C-11 ( $\delta_C$  205,2 ppm) und C-1' ( $\delta_C$  209,3 ppm) und anstelle des Vierten ein deutlich ins höhere Feld verschobenes quartäres C-Atom ( $\delta_C$  109,8 ppm, C-4). Diese chemische Verschiebung ließ vermuten, dass die Carbonylfunktion in der vorliegenden Verbindung durch eine Hemiketal-Struktur ersetzt ist. Auffällig war außerdem die Tieffeldverschiebung von C-12 ( $\delta_C$  83,4 ppm, anstelle von  $\delta_C$  75,9 ppm in **12**). Diese Indizien führten zur Vermutung, dass es zur Bildung eines Tetrahydrofuran-Rings als viertes Ringsystem kam, der C-4, C-5 ( $\delta_C$  66,3 ppm), C-6 ( $\delta_C$  52,4 ppm), C-12 und ein Sauerstoffatom umfasst.

Die relative Stereochemie an C-6 wurde anhand der NOESY-Daten ermittelt. Kreuzsignale zwischen  $H_a$ -10 ( $\delta_H$  2,14 ppm) und  $H_3$ -13 ( $\delta_H$  1,43 ppm) sowie zwischen  $H_b$ -10 ( $\delta_H$  2,18 ppm) und  $H_3$ -15 ( $\delta_H$  1,22 ppm) legten die relativen Positionen sowohl der beiden geminalen Methylgruppen  $H_3$ -13 und -14 sowie  $H_3$ -15 und -16, als auch der beiden Protonen  $H_a$ -10 und  $H_b$ -10 fest (**Abbildung 101, a**). Signale von  $H_3$ -16 ( $\delta_H$  1,11 ppm) und  $H_b$ -7 ( $\delta_H$  1,94 ppm),  $H_b$ -7 und H-6 ( $\delta_H$  2,35 ppm), H-6 und  $H_3$ -14 ( $\delta_H$  1,58 ppm) und auch  $H_a$ -7 ( $\delta_H$  1,88 ppm) und  $H_3$ -13 zeigten die  $\alpha$ -Orientierung von H-6 an (**Abbildung 101, b**).

a



b



**Abbildung 101** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **14** mit Korrelationen der Methylenprotonen H<sub>a/b</sub>-10 und H<sub>3</sub>-13 bzw. H<sub>3</sub>-15 (a) und den Protonen H-6, H<sub>2</sub>-7, H<sub>3</sub>-13, H<sub>3</sub>-14 und H<sub>3</sub>-16 (b)

Korrelationen zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-7 sowie H<sub>3</sub>-13 konnten auch detektiert werden, waren allerdings deutlich weniger intensiv als die zu H<sub>b</sub>-7 und H<sub>3</sub>-14 und unterstützen so die Vermutung der  $\alpha$ -Position des Protons (**Abbildung 101, b**).

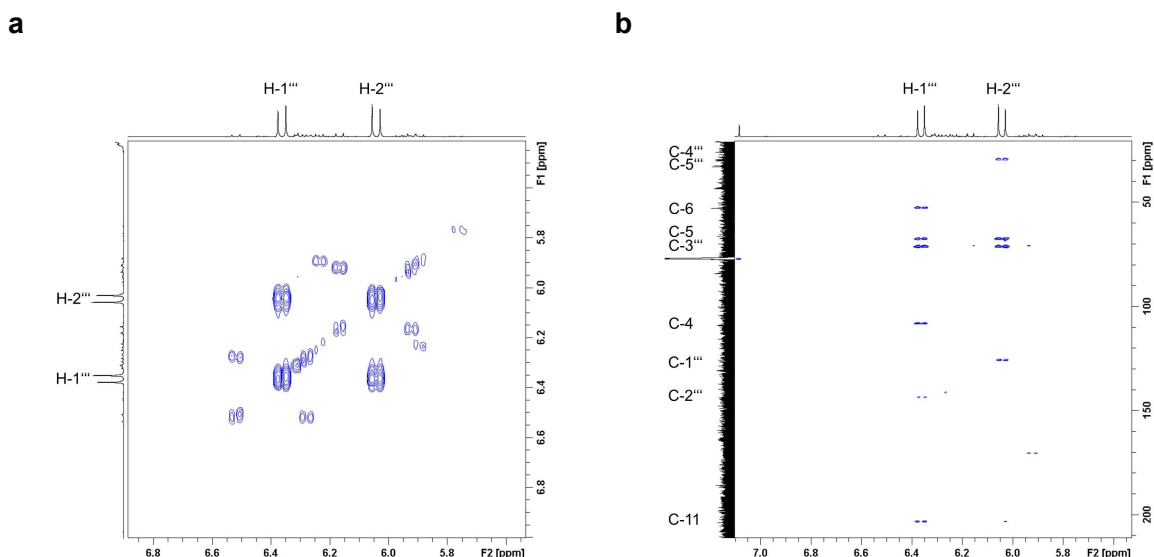
Die relative Stereochemie an C-4 konnte mithilfe der NOESY-Daten nicht bestimmt werden, da es sich bei dem Kohlenstoffatom in Position 4 um ein quartäres C-Atom handelt und das Wasserstoffatom der Hydroxygruppe trotz der Aufnahme der NMR-Spektren in deuteriertem Chloroform nicht detektiert werden konnte. Molekulare Modelle zeigten jedoch, dass der Ringschluss aufgrund der Ringspannung nur mit der  $\beta$ -Position möglich ist und das starre, tetrazyklische System die relative Stereochemie an allen Stereozentren (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6 und C-8) von sich aus vorgibt.

Bei der Verbindung handelt es sich daher um (3*S*\*,3*aS*\*,5*R*\*,7*S*\*,9*R*\*,9*aR*\*)-9*a*-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-3*a*,9-bis(3-methylbut-2-en-1-yl)-5-(2-methylbutanoyl)octahydro-3,7:5,9-dimethanocycloocta[*b*]furan-4,10(2*H*)-dion und erhält den Trivialnamen **Hirsutuman B**. Dieser Naturstoff wird in der Literatur bislang noch nicht beschrieben.

### Substanz 15

Das positive ESI-HRMS zeigte ein Pseudomolekülion  $[M+H]^+$  mit  $m/z$  501,3214 (berechnet 501,3211), woraus die Summenformel  $C_{30}H_{44}O_6$  festgelegt werden konnte. Die Analyse der  $^{13}C$ - und HSQC-NMR-Daten ergab elf quartäre, sechs Methin-, drei Methylen- und zehn Methyl-Kohlenstoffatome.

Die NMR-Spektren von **15** zeigten viele Gemeinsamkeiten mit denen von **14**. Es konnte ebenfalls ein Homoadamantan-Gerüst mit einem Acylrest an C-1, der in dieser Verbindung eine Isobutyryl-Untereinheit darstellt, und ein Isoprenrest an C-3 identifiziert werden. Auch liegt an C-4 ( $\delta_C$  108,2 ppm) eine Hemiketal-Struktur vor. Unterschiedlich ist das Auftreten von zwei deutlich entschirmten Protonen ( $\delta_H$  6,04 und 6,36 ppm), die als Dublett im  $^1H$ -NMR-Spektrum zur Resonanz kommen und wie in **Abbildung 102 (a)** gemäß den Kreuzsignalen im COSY-Spektrum zu sehen, benachbart sind.

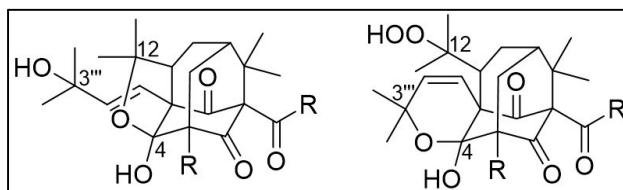


**Abbildung 102** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **15** mit Kreuzsignal der vicinalen Protonen H-1''' und H-2''' (a) und Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **15** mit Korrelationen der Protonen H-1''' und H-2''' zu C-4, C-5, C-6, C-11, C-1''', C-2''', C-3''', C-4''' und C-5''' (b)

Aus den HMBC-Korrelationen von H-1''' ( $\delta_H$  6,36 ppm) zu C-4, C-5 ( $\delta_C$  67,4 ppm), C-6 ( $\delta_C$  52,8 ppm), C-11 ( $\delta_C$  203,2 ppm) und auch zu C-2''' ( $\delta_C$  143,6 ppm) und C-3''' ( $\delta_C$  71,2 ppm) und von H-2''' ( $\delta_H$  6,04 ppm) zu C-5, C-1''' ( $\delta_C$  125,7 ppm), C-3''', C-4''' ( $\delta_C$  29,4 ppm) und C-5''' ( $\delta_C$  29,9 ppm) (**Abbildung 102, b**) ging die Verknüpfung einer weiteren Isopreneinheit an C-5 hervor,

deren Doppelbindung von C-2'''/C-3''' zu C-1'''/C-2''' verschoben und dessen C-3''' hydroxyliert ist.

Denkbar ist auch ein Hemiketal mit O-3''' und C-4 unter der Bildung eines zusätzlichen Dihydropyranrings, allerdings ist die Tieffeldverschiebung von C-12 ( $\delta_C$  84,0 ppm) in diesem Fall nur durch eine Peroxidation (**Abbildung 103**) zu erklären, was mit der Summenformel von  $C_{30}H_{44}O_6$  nicht konform ist.



**Abbildung 103** Potentielle Möglichkeiten für den Ringschluss in **15** und **16**

Des Weiteren weist die große Kopplungskonstante der beiden olefinischen Protonen ( $J$  16,3 Hz) auf eine *trans*-konjugierte Doppelbindung hin. Somit wurde das Grundgerüst entsprechend **14** angenommen. Das Stereozentrum in C-6 konnte analog **14** anhand der NOESY-Daten als  $\alpha$ -konfiguriert festgelegt werden.

Verbindung **15** konnte damit als (3*S*\*,3*aS*\*,5*R*\*,7*S*\*,9*R*\*,9*aR*\*)-9*a*-Hydroxy-3*a*-((*E*)-3-hydroxy-3-methylbut-1-en-1-yl)-5-isobutyryl-2,2,6,6-tetramethyl-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)octahydro-3,7:5,9-dimethanocycloocta[*b*]furan-4,10(2*H*)-dion identifiziert werden und wird **3'''-Hydroxyisohirsutuman A** benannt. Es ist ein bisher unbeschriebener Naturstoff.

### Substanz 16

Im ESI-HRMS von Substanz **16** war ein positives, pseudomolekulares Ion bei  $m/z$  515,3364  $[M+H]^+$  (berechnet 515,3367) zu finden, welches für die Berechnung der Summenformel  $C_{31}H_{46}O_6$  herangezogen wurde.

Durch sorgfältige Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Daten wird deutlich, dass es sich bei **16** um ein Homologes von **15**, mit einer 2-Methylbutyryl-Seitenkette, handelt. Auch die Konfiguration des Stereozentrums C-6 und der Doppelbindung 1'''/2''' konnte entsprechend **15** nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann die relative Konfiguration der Stereozentren für **14** bis **16** als  $1R^*$ ,  $3R^*$ ,  $4R^*$ ,  $5S^*$ ,  $6S^*$  und  $8S^*$  beschrieben werden.

Daher ergab sich für **16** die Bezeichnung (3*S*<sup>\*</sup>,3*aS*<sup>\*</sup>,5*R*<sup>\*</sup>,7*S*<sup>\*</sup>,9*R*<sup>\*</sup>,9*aR*<sup>\*</sup>)-9*a*-Hydroxy-3*a*-((*E*)-3-hydroxy-3-methylbut-1-en-1-yl)-2,2,6,6-tetramethyl-9-(3-methylbut-2-en-1-yl)-5-(2-methylbutanoyl)octahydro-3,7:5,9-dimethanocycloocta[*b*]furan-4,10(2*H*)-dion. Der bisher unbekannte Sekundärmetabolit erhält den Trivialnamen **3'''-Hydroxyisohirsutuman B**.

Auch für andere *Hypericum*-Arten wurden bereits solche komplexen, tetrazyklischen Acylphloroglucinole beschrieben. So wurden aus *H. sampsonii* **Sampsonion A** und **B**, Derivate von Substanz **14** mit aromatischem Acylrest (Hu und Sim 1998) sowie **Hypersampson D**, eine an C-3''' methoxylierten Variante und das **Hyphenron N** (Zhang et al. 2016) isoliert. **Hyphenron N** wurde zusammen mit **Hyphenron M** zum ersten Mal für *H. henryi* beschrieben (Yang et al. 2015). Auch in der Gattung *Clusia* sind solche komplexen Acylphloroglucinole zu finden. Cruz und Teixeira (2004) isolierten aus *C. obdeltifolia* neben **Sampsonion B** einen weiteren Vertreter, bei dem allerdings durch Hydroxylierung der Position C-3''' die Doppelbindung verloren gegangen ist.

## 2.3.4.4 Substanzen 17 und 18

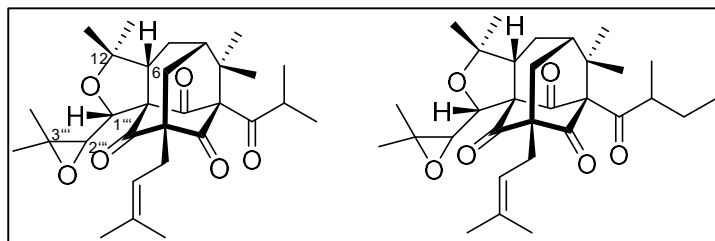


Abbildung 104 Strukturformeln der isolierten Substanzen 17 und 18

Tabelle 47  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 17 und 18; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

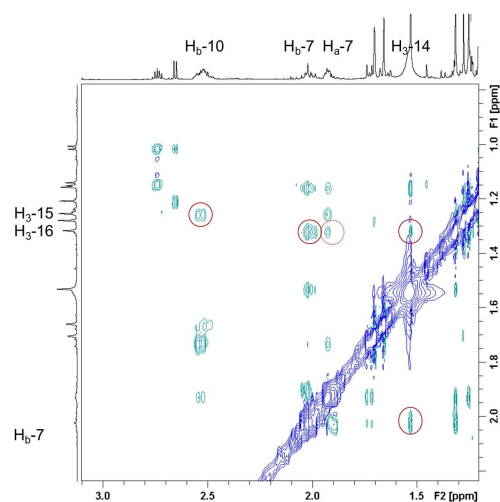
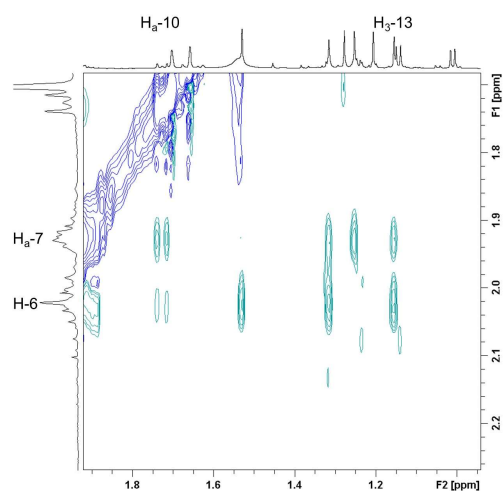
|                           | C/H  | Substanz 17         |                                       | Substanz 18         |                                       |
|---------------------------|------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
|                           |      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1    | 87,4                |                                       | 87,4                |                                       |
|                           | 2    | 203,4               |                                       | 203,3               |                                       |
|                           | 3    | 66,4                |                                       | 66,4                |                                       |
|                           | 4    | 204,5               |                                       | 204,7               |                                       |
|                           | 5    | 64,1                |                                       | 64,0                |                                       |
|                           | 6    | 45,0                | 2,02 (1H, m)                          | 44,9                | 2,02 (1H, m)                          |
|                           | 7    | 27,9                | a 1,91 (1H, m)<br>b 2,00 (1H, m)      | 27,8                | a 1,91 (1H, m)<br>b 1,99 (1H, m)      |
|                           | 8    | 43,3                | 1,92 (1H, m)                          | 43,4                | 1,92 (1H, m)                          |
|                           | 9    | 47,7                |                                       | 47,7                |                                       |
|                           | 10   | 39,4                | a 1,73 (1H, m)<br>b 2,53 (1H, m)      | 39,3                | a 1,72 (1H, m)<br>b 2,53 (1H, m)      |
|                           | 11   | 203,6               |                                       | 203,6               |                                       |
|                           | 12   | 81,0                |                                       | 81,0                |                                       |
|                           | 13   | 27,0                | 1,15 (3H, s)                          | 27,1                | 1,15 (3H, s)                          |
|                           | 14   | 20,0                | 1,53 (3H, s)                          | 20,0                | 1,53 (3H, s)                          |
|                           | 15   | 24,9                | 1,25 (3H, s)                          | 25,0                | 1,27 (3H, s)                          |
|                           | 16   | 23,1                | 1,32 (3H, s)                          | 22,9                | 1,29 (3H, s)                          |
| Acyl-Seitenkette          | 1'   | 209,7               |                                       | 209,4               |                                       |
|                           | 2'   | 40,5                | 2,74 (1H, sept, 6,4)                  | 47,1                | 2,47 (1H, m)                          |
|                           | 3'   | 21,4                | 1,01 (3H, d, 6,5)                     | 26,8                | a 1,27 (1H, m)<br>b 2,02 (1H, m)      |
|                           | 4'   | 21,0                | 1,14 (3H, d, 6,4)                     | 11,4                | 0,78 (3H, t, 7,4)                     |
|                           | 5'   |                     |                                       | 17,5                | 1,02 (3H, d, 6,5)                     |
| Isopren I                 | 1''  | 29,1                | a 2,50 (1H, m)<br>b 2,53 (1H, m)      | 29,1                | 2,52 (2H, m)                          |
|                           | 2''  | 119,5               | 5,17 (1H, t, 6,9)                     | 119,5               | 5,16 (1H, t, 6,8)                     |
|                           | 3''  | 134,1               |                                       | 134,1               |                                       |
|                           | 4''  | 25,9                | 1,70 (3H, s)                          | 18,0                | 1,66 (3H, s)                          |
|                           | 5''  | 18,0                | 1,66 (3H, s)                          | 24,9                | 1,69 (3H, s)                          |
| Isopren II                | 1''' | 78,9                | 5,13 (1H, d, 7,7)                     | 78,9                | 5,13 (1H, d, 7,7)                     |
|                           | 2''' | 61,6                | 2,65 (1H, d, 7,7)                     | 61,6                | 2,64 (1H, d, 7,7)                     |
|                           | 3''' | 66,2                |                                       | 66,4                |                                       |
|                           | 4''' | 17,4                | 1,28 (3H, s)                          | 17,4                | 1,28 (3H, s)                          |
|                           | 5''' | 25,0                | 1,21 (3H, s)                          | 24,9                | 1,20 (3H, s)                          |

### Substanz 17

Das positive Pseudomolekülion  $m/z$  499,3053  $[M+H]^+$  (berechnet 499,3054) im ESI-HRMS führte zur Berechnung der Summenformel  $C_{30}H_{42}O_6$  für Substanz **17**. Die 30 Kohlenstoffatome konnten über HSQC- und  $^{13}C$ -Daten als elf quartäre C-Atome, sechs Methin-, drei Methylen- und zehn Methylgruppen charakterisiert werden.

Das HMBC-Spektrum zeigte die notwendigen Korrelationen zur Ermittlung des Homoadamantan-Grundgerüsts mit einem Isobutyrylrest an C-1 ( $\delta_C$  87,4 ppm) und einer Isopreneinheit an C-3 ( $\delta_C$  66,4 ppm). Die Position von C-12 ( $\delta_C$  81,0 ppm) ist im Vergleich zu **10** und **12** (C-12  $\delta_C$  75,9 ppm) tieffeldverschoben und ähnelt stärker **14** (C-12  $\delta_C$  83,4 ppm). Die ebenfalls deutlich entschirmte Lage der Methingruppe C-1''' ( $\delta_C$  78,9 ppm) führte zur Annahme der Bildung eines Tetrahydrofuran-Ringsystems mit C-5, C-6, C-12, C-1''' und einem Sauerstoffatom. Die beiden ebenfalls auffällig tieffeldverschobenen C-Atome C-2''' ( $\delta_C$  61,6 ppm) und C-3''' ( $\delta_C$  66,2 ppm) sowie ein zusätzliches O-Atom in der Summenformel lassen auf eine 2''', 3'''-Oxiran-Einheit schließen.

Mithilfe der im NOESY-Spektrum ermittelten Kreuzsignale von  $H_b$ -10 ( $\delta_H$  2,53 ppm) und  $H_3$ -15 ( $\delta_H$  1,25 ppm), von  $H_3$ -16 ( $\delta_H$  1,32 ppm) und  $H_3$ -14 ( $\delta_H$  1,53 ppm) und von  $H_3$ -14 und zu  $H_b$ -7 ( $\delta_H$  2,00 ppm) wurden die relativen Positionen sowohl der geminalen Methylgruppen  $H_3$ -13 und  $H_3$ -14 und  $H_3$ -15 und  $H_3$ -16, als auch der beiden Methylenprotonen  $H_a$ -10 und  $H_b$ -10 festgelegt. Durch ein wesentlich deutlicheres Kreuzsignal zwischen  $H_3$ -16 und  $H_b$ -7 als  $H_a$ -7 konnte die  $\alpha$ -Orientierung des Protons  $H_b$ -7 ermittelt werden (**Abbildung 105, a**).

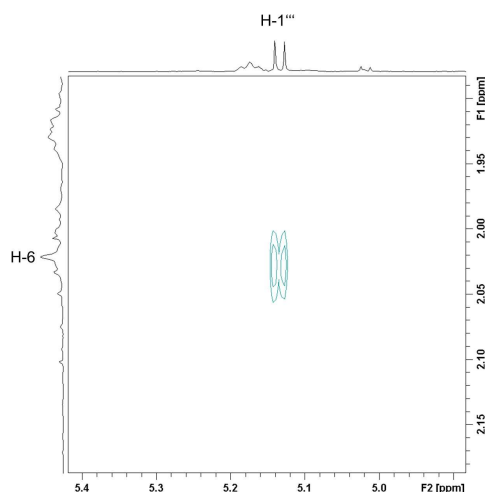
**a****b**

**Abbildung 105** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **17** mit Kreuzsignalen sowohl zwischen den Protonen H<sub>b</sub>-7 und H<sub>3</sub>-15, H<sub>3</sub>-15 und H<sub>3</sub>-14 sowie H<sub>3</sub>-14 und H<sub>b</sub>-7, als auch zwischen H<sub>3</sub>-16 und H<sub>b</sub>-7 und weniger deutlich H<sub>a</sub>-7 (**a**) und der Methylgruppe H<sub>3</sub>-13 als auch H<sub>a</sub>-10 jeweils zu H-6 und H<sub>a</sub>-7 (**b**)

**Abbildung 105 (b)** zeigt NOESY-Kreuzsignale zwischen H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,15 ppm) und einerseits  $\delta_{\text{H}}$  1,91 ppm (H<sub>a</sub>-7) und andererseits  $\delta_{\text{H}}$  2,02 ppm (H-6), die auf eine  $\beta$ -Position des Protons im Chiralitätszentrum C-6 schließen ließen. Gestützt wurde diese Vermutung zusätzlich durch Korrelationen von H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  1,73 ppm) und H<sub>a</sub>-7 und auch H-6.

Da ein deutlicher NOE-Effekt zwischen H<sub>b</sub>-6 und H-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  5,13 ppm) auszumachen war, konnte auch dieses Proton als  $\beta$ -konfiguriert beschrieben werden (**Abbildung 106**).





**Abbildung 106** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **17** mit Interaktion von H-6 und H-1'''

Aufgrund der freien Drehbarkeit der Bindung C-1'''/C-2''' konnte das Stereozentrum an C-2''' mit den hier verwendeten Methoden relativ zu den anderen Stereozentren nicht genauer charakterisiert werden. Auch konnten in der Literatur keine vergleichbaren Verbindungen gefunden werden, durch die Rückschlüsse auf die Konfiguration an C-2''' möglich sind.

Daher konnte die Verbindung als (3*R*\*,3*aS*\*,5*S*\*,7*R*\*,9*S*\*,10*aR*\*)-3-(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)-7-isobutyryl-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)hexahydro-3*H*,4*H*-3*a*,7:5,9-dimethanocyclonona[*c*]furan-4,6,12(5*H*)-trion identifiziert werden. Der bislang unbeschriebene Naturstoff erhält den Trivialnamen **Hirsutelan A**.

### Substanz 18

Entsprechend dem Pseudomolekülion mit  $m/z$  513,3209  $[M+H]^+$  (berechnet 513,3211) im positiven ESI-HRMS ergibt sich für Substanz **18** eine Summenformel von C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub>.

Aufgrund der nahezu identischen NMR-Daten von **17** und **18** und dem Unterschied von lediglich einer Methylengruppe in der Summenformel konnte die Struktur von **17** auch für **18** lediglich mit der Variation der Acylseitenkette angenommen werden. Durch HMBC-Korrelationen von H<sub>2</sub>-3' ( $\delta_C$  26,8 ppm,  $\delta_H$  2,02 und 1,27 ppm) zu C-1' ( $\delta_C$  209,4 ppm), C-2' ( $\delta_C$  47,1 ppm), C-4' ( $\delta_C$  11,4 ppm) und C-5' ( $\delta_C$  17,5 ppm) wurde diese Vermutung bestätigt.

Auswertung der NOESY-Daten führte zu den gleichen Ergebnissen wie für **17**.

Für den komplexen und starren Grundkörper von **17** und **18** konnte die Konfiguration der zahlreichen Chiralitätszentren als  $1R^*$ ,  $3S^*$ ,  $5S^*$ ,  $6R^*$ ,  $8S^*$  und  $1'''R^*$  festgelegt werden.

Bei der Verbindung handelt es sich um  $(3R^*, 3aS^*, 5S^*, 7R^*, 9S^*, 10aR^*)$ -3-(3,3-Dimethyloxiran-2-yl)-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)hexahydro-3*H*,4*H*-3a,7:5,9-dimethanocyclonona[*c*]furan-4,6,12(5*H*)-trion, einen bislang unbekannten Sekundärmetaboliten, der den Trivialnamen **Hirsutelan B** erhält.

Aus den bereits mehrmals genannten *Hypericum*-Arten *H. sampsonii* und *H. henryi* konnten abermals ähnliche Substanzen, nämlich das **Hypersampson O** (Tian et al. 2014a) und das **Hyphenron O** (Yang et al. 2015) isoliert werden. Diese beiden Substanzen weisen auch eine zusätzliche Tetrahydrofuran-Einheit C-5, C-6 C-12 und C-1''' auf, allerdings ist ein aromatischer Acylrest und keine Oxiran-Einheit C-2'''/C-3''' zu finden.

## 2.3.4.5 Substanzen 19, 20 und 21

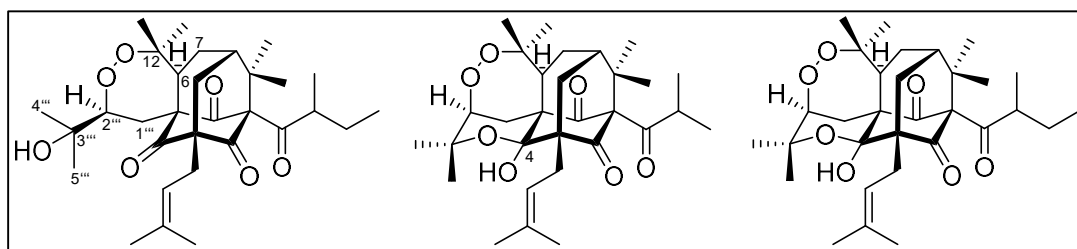


Abbildung 107 Strukturformeln der isolierten Substanzen 19, 20 und 21

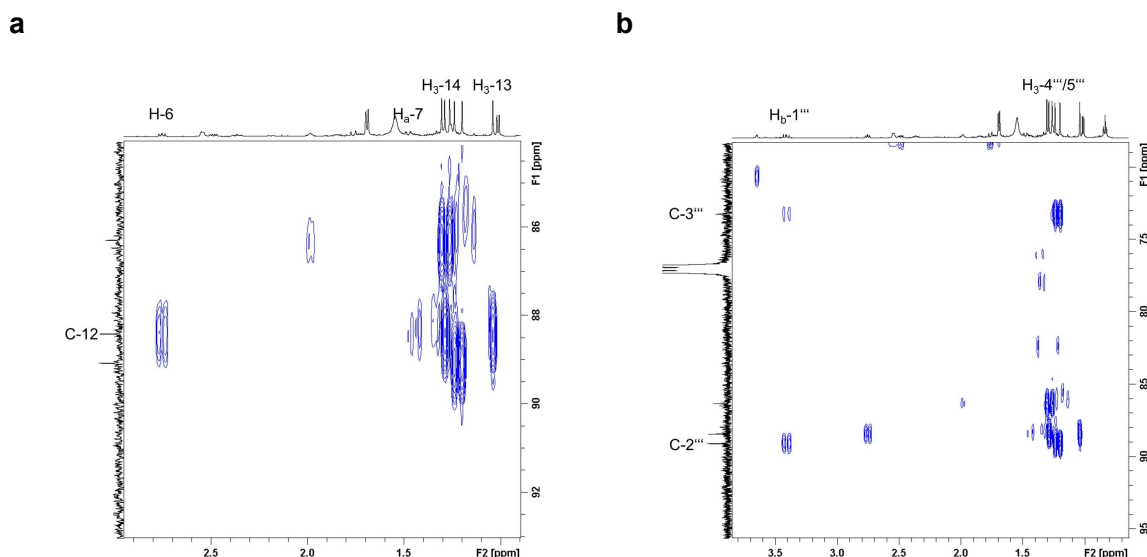
Tabelle 48  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 19, 20 und 21; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                           | Substanz 19 |  | Substanz 20  |  | Substanz 21  |  |  |
|---------------------------|-------------|--|--|--|--|--|--|
|                           | C/H         | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$<br>$\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) |  |
| Homoadamantan-Grundgerüst | 1           | 86,3   | 86,0   |  | 86,0   |  |  |
|                           | 2           | 204,2  | 206,4  |  | 206,4  |  |  |
|                           | 3           | 68,0   | 55,9   |  | 55,9   |  |  |
|                           | 4           | 204,7  | 109,7  |  | 109,6  |  |  |
|                           | 5           | 66,6   | 62,7   |  | 62,7   |  |  |
|                           | 6           | 42,7   | 2,76 (1H, dd, 8,1, 10,8)                                     | 41,8   | 2,68 (1H, m)   | 41,8   | 2,67 (1H, m)   |
|                           | 7           | 31,4   | a 1,44 (1H, m)<br>b 2,37 (1H, ddd, 4,8, 10,7, -15,4)         | 25,8   | a 1,90 (1H, dd, 7,5, -17,7)<br>b 2,04 (1H, dd, 11,0, -17,9)  | 25,8   | a 1,90 (1H, m)<br>b 2,05 (1H, m)                           |
|                           | 8           | 44,2   | 1,99 (1H, m)   | 45,4   | 1,70 (1H, m)   | 45,5   | 1,69 (1H, m)   |
|                           | 9           | 49,5   |  | 47,3   |  | 47,5   |  |
|                           | 10          | 40,7   | a 1,76 (1H, m)<br>b 2,48 (1H, dd, 6,1, -14,3)                | 31,6   | a 2,14 (1H, d, -15,0)<br>b 2,28 (1H, dd, 6,6, -15,0)         | 31,7   | a 2,14 (1H, m)<br>b 2,28 (1H, dd, 6,6, -15,0)              |
|                           | 11          | 207,3  |  | 208,6  |  | 208,5  |  |
|                           | 12          | 88,4   |  | 82,9   |  | 82,9   |  |
|                           | 13          | 17,8   | 1,04 (3H, s)   | 27,0   | 1,52 (3H, s)   | 27,0   | 1,52 (3H, s)   |
|                           | 14          | 28,2   | 1,29 (3H, s)   | 32,1   | 1,43 (3H, s)   | 32,1   | 1,43 (3H, s)   |
|                           | 15          | 24,6   | 1,30 (3H, s)   | 24,5   | 1,25 (3H, s)   | 24,5   | 1,24 (3H, s)   |
|                           | 16          | 22,6   | 1,26 (3H, s)   | 22,1   | 1,08 (3H, s)   | 22,1   | 1,08 (3H, s)   |
| Acyl-Seitenkette          | 1'          | 206,6  | 209,7  |  | 209,4  |  |  |
|                           | 2'          | 50,0   | 1,73 (1H, m)   | 41,9   | 2,39 (1H, sept, 6,5)   | 48,3   | 2,13 (1H, m)   |
|                           | 3'          | 26,8   | a 1,32 (1H, m)<br>b 1,84 (1H, ddd, 2,4, 7,4, -13,4)          | 20,2   | 1,12 (3H, d, 6,5)  | 26,2   | a 1,34 (1H, m)<br>b 1,94 (1H, m)                           |
|                           | 4'          | 11,7   | 0,83 (3H, t, 7,4)  | 21,1   | 1,06 (3H, d, 6,5)  | 11,2   | 0,82 (3H, t, 7,5)  |
|                           | 5'          | 17,2   | 1,01 (3H, d, 6,6)  |  |  | 17,2   | 1,06 (3H, d, 6,5)  |
| Isopren I                 | 1''         | 29,6   | 2,55 (2H, m)   | 27,5   | a 2,37 (1H, m)<br>b 2,72 (1H, dd, 4,8, -14,9)                | 27,5   | a 2,37 (1H, dd, 9,3, -14,9)<br>b 2,72 (1H, dd, 4,8, -14,9) |
|                           | 2''         | 119,0  | 5,08 (1H, t, 6,8)  | 119,4  | 5,26 (1H, t, 7,4)  | 119,5  | 5,25 (1H, m)   |
|                           | 3''         | 135,1  |  | 134,8  |  | 134,7  |  |
|                           | 4''         | 18,1   | 1,68 (3H, s)   | 18,0   | 1,62 (3H, s)   | 18,0   | 1,71 (3H, s)   |
|                           | 5''         | 26,0   | 1,70 (3H, s)   | 26,0   | 1,71 (3H, s)   | 26,0   | 1,62 (3H, s)   |
| Isopren II                | 1'''        | 30,1   | a 1,48 (1H, dd, 2,8, -15,0)<br>b 3,41 (1H, dd, 11,6, -14,9)  | 37,7   | a 2,56 (1H, dd, 7,9, -13,4)<br>b 2,65 (1H, dd, 7,9, -13,7)   | 37,7   | a 2,56 (1H, dd, 8,0, -13,4)<br>b 2,63 (1H, dd, 7,7, -13,5) |
|                           | 2'''        | 89,1   | 4,76 (1H, dd, 2,8, 11,6)                                     | 84,0   | 4,30 (1H, t, 7,8)  | 84,0   | 4,30 (1H, t, 7,8)  |
|                           | 3'''        | 73,2   |  | 70,3   |  | 70,2   |  |
|                           | 4'''        | 24,9   | 1,24 (3H, s)   | 24,8   | 1,08 (3H, s)   | 25,0   | 1,08 (3H, s)   |
|                           | 5'''        | 25,9   | 1,20 (3H, s)   | 27,9   | 1,28 (3H, s)   | 27,8   | 1,27 (3H, s)   |

**Substanz 19**

Die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_7$  für Substanz **19** wurde per ESI-HRMS, welche ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  531,3310  $[M+H]^+$  (berechnet 531,3316) ergab, bestimmt. Das  $^{13}C$ -NMR-Spektrum von **19** zeigt 31 Kohlenstoffatome, von denen elf quartär, fünf tertiär, fünf sekundär und zehn primär sind.

Neben dem Homoadamantan-Grundgerüst, der 2-Methylbutyryl-Einheit und dem Isoprenrest an C-3 fielen die beiden tieffeldverschobenen C-Atome C-12 ( $\delta_C$  88,4 ppm) und C-2''' ( $\delta_C$  89,1 ppm) auf. Die in **Abbildung 108 (a)** dargestellten HMBC-Kreuzsignale von den beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  1,04 ppm) und H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_H$  1,29 ppm), dem Methinproton H-6 ( $\delta_H$  2,76 ppm) und dem Methylenproton H<sub>a</sub>-7 ( $\delta_H$  1,44 ppm) zum quartären Kohlenstoffatom C-12 indizieren eine Isopropyl-Untereinheit an C-6 ( $\delta_C$  42,7 ppm).

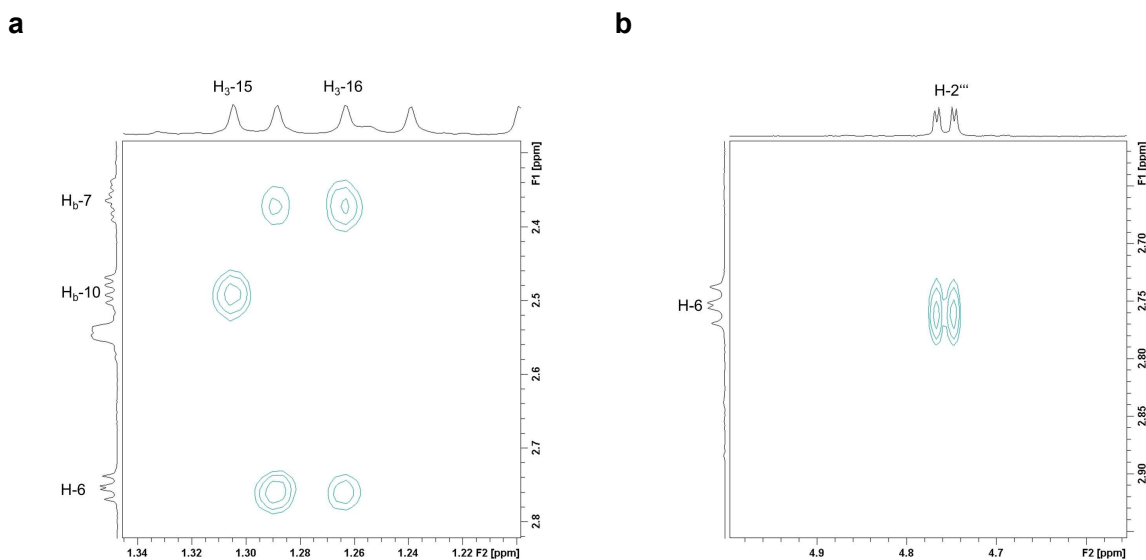


**Abbildung 108** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **19** mit Korrelationen von H-6, H<sub>a</sub>-7, H<sub>3</sub>-13 und H<sub>3</sub>-14 zu C-6 (**a**) und von H<sub>b</sub>-1''', H<sub>3</sub>-4''' und H<sub>3</sub>-5''' zu C-2''' und C-3''' (**b**)

Detektiert wurden außerdem Signale sowohl zwischen den beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-4''' ( $\delta_H$  1,24 ppm) und H<sub>3</sub>-5''' ( $\delta_H$  1,20 ppm) als auch H-1''' ( $\delta_H$  3,41 ppm) und den Kohlenstoffatomen C-2''' und C-3''' ( $\delta_C$  73,2 ppm) (**Abbildung 108, b**). Die Entschirmung von C-3''' ist charakteristisch für ein quartäres C-Atom mit einer Hydroxy-Funktion und den beiden geminalen Methylgruppen. Somit konnte eine 2-Hydroxyisopentanyl-Einheit an C-5 ( $\delta_C$  66,6 ppm) angenommen werden. Die Tieffeldverschiebung der C-Atome C-12 und C-2''' zusammen mit der Anzahl der

Sauerstoffatome in der errechneten Summenformel weisen auf das Vorliegen einer Peroxid-Brücke als Verbindung dieser Kohlenstoffatome hin. Die hohe Übereinstimmung mit den 1D- und 2D-NMR-Daten von **Plukenetion C**, einem Inhaltsstoff aus *C. plukenetii* (Henry et al. 1999) bekräftigt die vorgeschlagene Struktur für Substanz **19**.

Für die Bestimmung der relativen Stereochemie an C-6 und C-2''' wurden die NOESY-Daten ausgewertet. Kreuzsignale von H<sub>b</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,48 ppm) und H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,30 ppm), von H<sub>3</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  1,26 ppm) und zum einen H<sub>b</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2,37 ppm), zum anderen H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,76 ppm) legten zusammen mit dem nicht vorhandenen Signal von H-6 und H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  1,76 ppm) die  $\alpha$ -Orientierung für das Proton an C-6 fest (**Abbildung 109, a**).



**Abbildung 109** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **19** mit Kreuzsignalen von H<sub>b</sub>-10 und H<sub>3</sub>-15 und von H<sub>3</sub>-16 und sowohl H<sub>b</sub>-7 und H-6 (**a**) und mit der Korrelation H-2''' und H-6 (**b**)

Aufgrund eines sehr ausgeprägten NOE-Effektes zwischen H-6 und H-2''' ( $\delta_{\text{H}}$  4,76 ppm) konnte auch dieses Proton als  $\alpha$ -konfiguriert beschrieben werden (**Abbildung 109, b**).

Zusammenfassend kann die relative Stereochemie der Chiralitätszentren als 1*R*\*, 3*S*\*, 5*R*\*, 6*S*\*, 8*S*\*, 2'''*S*\* festgelegt werden.

Die Verbindung konnte als (4*S*\*,5*aR*\*,7*S*\*,9*R*\*,11*S*\*,12*aS*\*)-4-(2-hydroxypropan-2-yl)-1,1,10,10-tetramethyl-7-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9-(2-methylbutanoyl)octahydro-6*H*-5*a*,9:7,11-dimethanocyclonona[*d*][1,2]dioxepin-6,8,14(7*H*)-trion identifiziert werden und erhält den Trivialnamen **Hyperihirsan B**. Es handelt sich dabei um einen bislang nicht beschriebenen Naturstoff.

Die eng verwandte Substanz **33-Hydroperoxyisoplukenetion C** konnte neben **Plukenetion C** aus einer *Clusia*-Art isoliert werden (Christian et al. 2001). Aber auch in einer *Hypericum*-Art konnte das **Plukenetion C** und zwei weitere sehr ähnliche Derivate, **Peroxysampson A** und **B**, gefunden werden (Xiao et al. 2010), wobei Zweiteres eine inverse Konfiguration an C-6 und C-2''' aufweist. In 2016 berichteten Zhu et al. (2016b) von zwei weiteren Vertretern dieser Strukturklasse: **Hyperisampsin N** und **O**, die ebenfalls aus *H. sampsonii* isoliert werden konnten. **Hyperisampsin N** besitzt dabei vergleichbare Konfiguration wie **Peroxysampson B**. Die gleichartige Verbindung, **Otogirinin B**, wie sie in *H. erectum* (Ishida et al. 2010) vorkommt, wurde auch für *H. sampsonii* (Zhu et al. 2016b) und gemeinsam mit **Peroxysampson B** für *H. attenuatum* (Li et al. 2015a) beschrieben. Die strukturell ähnliche Substanz **Garcimultifloron G** ist ein Inhaltsstoff aus *G. multiflora* und wurde bislang für keine *Hypericum*-Art beschrieben (Ting et al. 2014).

### Substanz 20

Im ESI-HRMS von Substanz **20** konnte ein pseudomolekulares Ion mit  $m/z$  517,3169  $[M+H]^+$  (berechnet 517,3160) detektiert werden, welches zur Berechnung der Summenformel  $C_{30}H_{44}O_7$  herangezogen wurde.

Der NMR-Datensatz von **20** stimmt weitestgehend mit dem von **19** überein. Es lag allerdings, wie bereits mehrfach besprochen ein Isobutyryl-Rest als Acylseitenkette vor.

Der markanteste Unterschied bei den NMR-Daten ist die Verschiebung von C-4 ( $\delta_c$  109,7 ppm für **20** und  $\delta_c$  204,7 ppm für **19**), die mit der Bildung einer Hemiketal-Struktur an C-4 durch Ringschluss zwischen C-4 und der Hydroxygruppe an C-3''', ähnlich zu **14** bis **16**, erklärt werden konnte. So kommt es zur Bildung einer zusätzlichen Tetrahydropyran-Untereinheit, welche die Kohlenstoffatome C-4, C-5, C-1''', C-2''', C-3''' und ein Sauerstoffatom umfasst.

Aufgrund des komplex verschachtelten, pentazyklischen Grundgerüsts sind die Freiheitsgrade für die Stereochemie sehr eingeschränkt. Abgeleitet von NOE-Korrelationen vergleichbar mit **19** definiert sich abermals eine  $\alpha$ -Orientierung für H-6. In Folge der hohen Ringspannung müssen auch H-2''' und OH-4 die  $\alpha$ -Position einnehmen.

Es handelt sich bei der Verbindung um (3*S*\*,7*S*\*,7*aS*\*,9*R*\*,11*S*\*,13*R*\*,13*aR*\*)-13*a*-Hydroxy-9-isobutyryl-2,2,6,6,10,10-hexamethyl-13-(3-methylbut-2-en-1-yl)decahydro-8*H*-3,7*a*:7,11:9,13-trimethanocycloocta[*f*][1,2,5]trioxonin-8,14-dion, welches den Trivialnamen **Pyranohyperihirsan A** erhält und in der Literatur bislang noch nicht beschrieben wurde.

### Substanz 21

Die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_7$  für Substanz **21** ist auf das Pseudomolekülion  $m/z$  531,3319  $[M+H]^+$  (berechnet 531,3316) im ESI-HRMS zurückzuführen.

Wie bereits mehrfach erwähnt, deuten der Unterschied von 14 Masseinheiten und beinahe identische NMR-Daten von **20** und **21** auf gleichartige Strukturen hin, die sich lediglich in der Starter-säure unterscheiden. Zur Bestätigung konnte das charakteristische Triplet ( $H_3-4'$   $\delta_H$  0,82 ppm) sowie das Dublett ( $H_3-5'$   $\delta_H$  1,06 ppm) der Methylgruppen und zugehörige HMBC-Signale zu C-1' ( $\delta_C$  209,4 ppm), C-2' ( $\delta_C$  48,3 ppm) und C-3' ( $\delta_C$  26,2 ppm) ermittelt werden.

Die Konfiguration der Stereozentren wurde analog **21** festgelegt. Somit ergibt sich für die Chiralitätszentren von **20** und **21** die Konfiguration  $1R^*$ ,  $3R^*$ ,  $4R^*$ ,  $5S^*$ ,  $6S^*$ ,  $8S^*$ ,  $2''''S^*$ .

Die Verbindung wurde als (3*S*<sup>\*</sup>,7*S*<sup>\*</sup>,7*aS*<sup>\*</sup>,9*R*<sup>\*</sup>,11*S*<sup>\*</sup>,13*R*<sup>\*</sup>,13*aR*<sup>\*</sup>)-13*a*-Hydroxy-2,2,6,6,10,10-hexamethyl-13-(3-methylbut-2-en-1-yl)-9-(2-methylbutanoyl)decahydro-8*H*-3,7*a*:7,11:9,13-trime-thanocycloocta[*f*][1,2,5]trioxonin-8,14-dion identifiziert und **Pyranohyperihirsan B** benannt.

In der Literatur konnten keine anderen als die hier beschriebenen Strukturen gefunden werden, die neben dem Siebenring-System mit Peroxo-Struktur einen fünften Ringschluss zwischen C-2'''' und dem Sauerstoffatom an C-4 aufweisen.

## 2.3.4.6 Substanzen 22, 23, 24 und 25

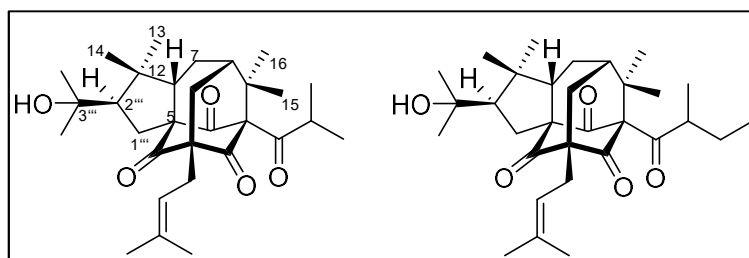


Abbildung 110 Strukturformeln der isolierten Substanzen 22 und 23

Tabelle 49  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen 22 und 23; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                           | C/H  | Substanz 22         |  | Substanz 23         |  |
|---------------------------|------|---------------------|--|---------------------|--|
|                           |      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, J in Hz)                        | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, J in Hz)                        |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1    | 85,8                |  | 85,6                |  |
|                           | 2    | 204,4               |  | 204,4               |  |
|                           | 3    | 67,3                |  | 67,3                |  |
|                           | 4    | 205,3               |  | 205,4               |  |
|                           | 5    | 73,3                |  | 73,3                |  |
|                           | 6    | 54,8                | 2,26 (1H, dd, 7,4, 12,6)                                   | 54,8                | 2,25 (1H, dd, 7,4, 12,5)                                   |
|                           | 7    | 24,6                | a 1,70 (1H, m)<br>b 1,96 (1H, m)                           | 24,6                | a 1,69 (1H, m)<br>b 1,96 (1H, m)                           |
|                           | 8    | 42,1                | 1,98 (1H, m)   | 42,2                | 1,97 (1H, m)   |
|                           | 9    | 47,0                |  | 47,1                |  |
|                           | 10   | 35,1                | a 2,09 (1H, d, -14,8)<br>b 2,38 (1H, m)                    | 35,1                | a 2,08 (1H, d, -14,8)<br>b 2,37 (1H, m)                    |
|                           | 11   | 203,8               |  | 203,7               |  |
|                           | 12   | 47,0                |  | 46,9                |  |
|                           | 13   | 26,9                | 1,10 (3H, s)   | 26,9                | 1,10 (3H, s)   |
|                           | 14   | 27,3                | 1,21 (3H, s)   | 27,4                | 1,21 (3H, s)   |
|                           | 15   | 24,9                | 1,25 (3H, s)   | 24,9                | 1,25 (3H, s)   |
|                           | 16   | 22,4                | 1,26 (3H, s)   | 22,5                | 1,27 (3H, s)   |
| Acyl-Seitenkette          | 1'   | 207,5               |  | 207,1               |  |
|                           | 2'   | 43,0                | 1,91 (1H, sept, 6,5)                                       | 49,5                | 1,66 (1H, m)   |
|                           | 3'   | 20,3                | 1,05 (3H, d, 6,6)  | 26,5                | a 1,28 (1H, m)<br>b 1,76 (1H, m)                           |
|                           | 4'   | 20,8                | 1,01 (3H, d, 6,6)  | 11,6                | 0,81 (3H, t, 7,4)  |
|                           | 5'   |                     |  | 16,9                | 0,97 (3H, d, 6,6)  |
| Isopren I                 | 1''  | 29,0                | 2,53 (2H, m)   | 29,1                | 2,53 (2H, m)   |
|                           | 2''  | 118,7               | 5,20 (1H, t, 7,4)  | 11,7                | 5,19 (1H, t, 7,3)  |
|                           | 3''  | 135,4               |  | 135,4               |  |
|                           | 4''  | 18,0                | 1,65 (3H, s)   | 18,0                | 1,65 (3H, s)   |
|                           | 5''  | 26,1                | 1,72 (3H, s)   | 26,1                | 1,73 (3H, s)   |
| Isopren II                | 1''' | 30,5                | a 2,66 (1H, dd, 6,7, -14,3)<br>b 2,40 (1H, dd, 8,6, -14,2) | 30,5                | a 2,66 (1H, dd, 6,9, -14,3)<br>b 2,38 (1H, dd, 2,9, -14,5) |
|                           | 2''' | 59,1                | 2,20 (1H, t, 7,5)  | 59,1                | 2,21 (1H, t, 7,6)  |
|                           | 3''' | 73,4                |  | 73,4                |  |
|                           | 4''' | 30,5                | 1,40 (3H, s)   | 30,5                | 1,40 (3H, s)   |
|                           | 5''' | 31,8                | 1,39 (3H, s)   | 31,8                | 1,39 (3H, s)   |

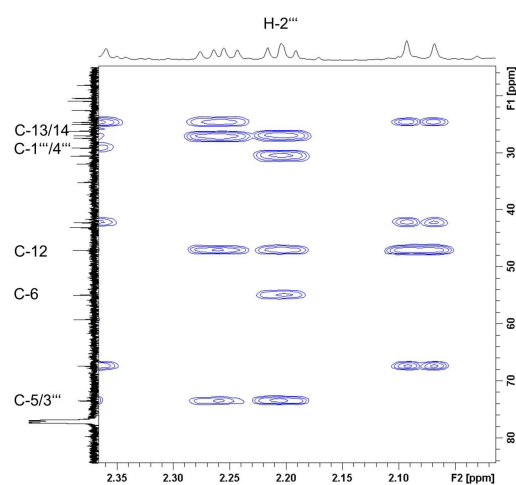


### Substanz 22

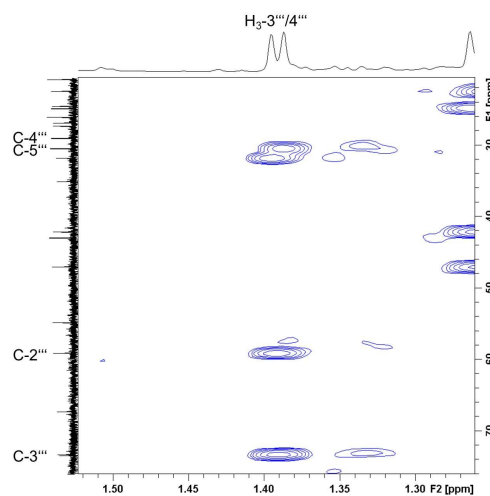
Die Summenformel  $C_{30}H_{44}O_5$  für Substanz **22** ergab sich aus dem mittels ESI-HRMS gefundenen Pseudomolekülion bei  $m/z$  485,3260  $[M+H]^+$  (berechnet 485,3262). Die Auswertung des HSQC-Spektrums ergab, dass es sich bei den 30 Kohlenstoffatomen um elf quartäre, fünf tertiäre, vier sekundäre und zehn primäre C-Atome handelt.

Die HMBC-Signale wiesen neben den bekannten Strukturmerkmalen, einem Homoadamantan-Grundgerüst, einer Acylseitenkette, die hier einem Isobutyryl-Rest entspricht und einer Isopreneinheit, einen zusätzlichen Ringschluss zwischen C-12 und C-2''' auf. Diese Annahme wurde auf den Verlust des zweiten olefinischen Protons H-2''' ( $\delta_H$  2,20 ppm) und der stattdessen gefundenen HMBC-Korrelationen zu den quartären C-Atomen C-5 ( $\delta_C$  73,3 ppm), C-12 ( $\delta_C$  47,0 ppm) und C-3''' ( $\delta_C$  73,4 ppm), dem tertiären C-6 ( $\delta_C$  54,8 ppm), dem sekundären C-1''' ( $\delta_C$  30,5 ppm) und den Methylgruppen C-13 ( $\delta_C$  26,9 ppm), C-14 ( $\delta_C$  27,3 ppm) und C-4''' ( $\delta_C$  30,5 ppm) gestützt (**Abbildung 111, a**).

a



b



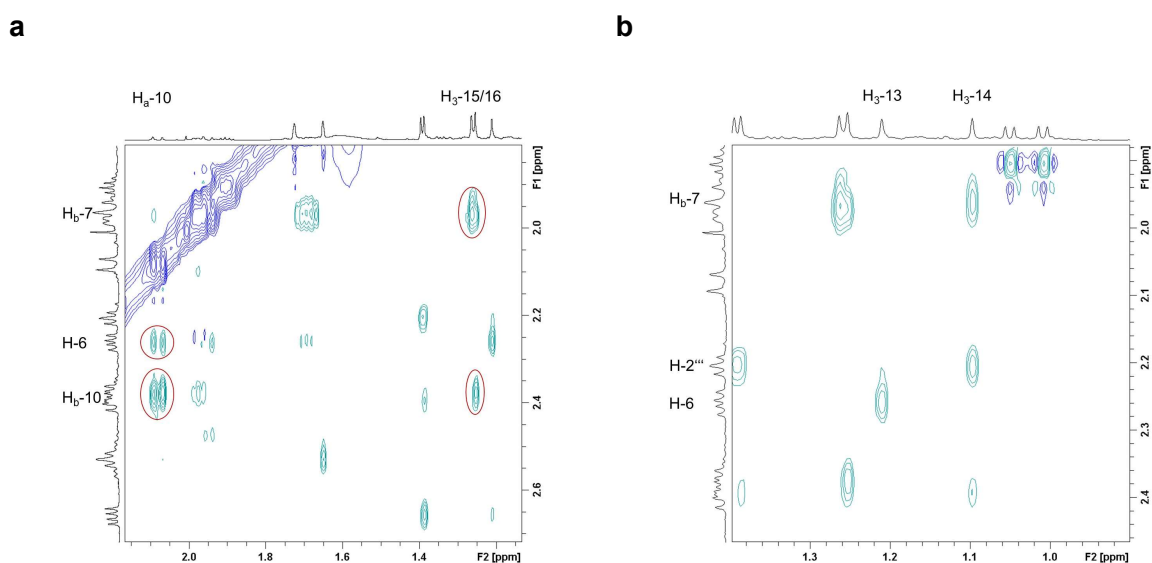
**Abbildung 111** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **22** mit Korrelationen von H-2''' zu C-5, C-6, C-12, C-13, C-14, C-1''', C-3''' und C-4''' (**a**) und H<sub>3</sub>-3''' und H<sub>3</sub>-4''' zu C-2''', C-3''' und entweder C-4''' oder C-5''' (**b**)

Die beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-4''' ( $\delta_H$  1,40 ppm) und H<sub>3</sub>-5''' ( $\delta_H$  1,39 ppm) zeigten Kreuzsignale mit C-2''' ( $\delta_C$  59,1 ppm), C-3''' und dem jeweils anderen Kohlenstoffatom C-4''' und C-5''' ( $\delta_C$  31,8 ppm) (**Abbildung 111, b**). Die Tieffeldverschiebung von C-3''' deutete auf eine

direkt gebundene Hydroxygruppe hin. Somit bildeten C-3''' bis C-5''' eine 2-Hydroxyisopropyl-Einheit an C-2'''.

Die relative  $\beta$ -Position von H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,26 ppm) wurde anhand von NOE-Signalen zwischen H<sub>b</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,38 ppm) und H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,25 ppm), zwischen H<sub>3</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  1,26 ppm) und H<sub>b</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,96 ppm) und zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,09 ppm) ermittelt (**Abbildung 112, a**).

Aufgrund von Korrelationen von H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,21 ppm) und H-6 sowie H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1,10 ppm) und H<sub>b</sub>-7 wie auch H-2''' wurde auch die 2-Hydroxyisopropyl-Einheit an C-2''' als  $\beta$ -konfiguriert bestimmt (**Abbildung 112, b**).



**Abbildung 112** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **22** mit Kreuzsignalen von H<sub>b</sub>-10 und H<sub>3</sub>-15, H<sub>3</sub>-16 und H<sub>b</sub>-7 und H-6 und H<sub>a</sub>-10 (**a**) und Korrelationen zwischen H<sub>3</sub>-13 und H-6 und zwischen H<sub>3</sub>-14 und sowohl H<sub>b</sub>-7 als auch H-2''' (**b**)

Bei der Verbindung handelt es sich um (2R\*,3aR\*,5S\*,7R\*,9S\*,10aS\*)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-7-isobutyryl-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)octahydro-4*H*-3a,7:5,9-dimethanocyclopenta[9]annulen-4,6,12(5*H*)-trion, welches den Trivialnamen **Hirsutusal A** erhält und in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde.

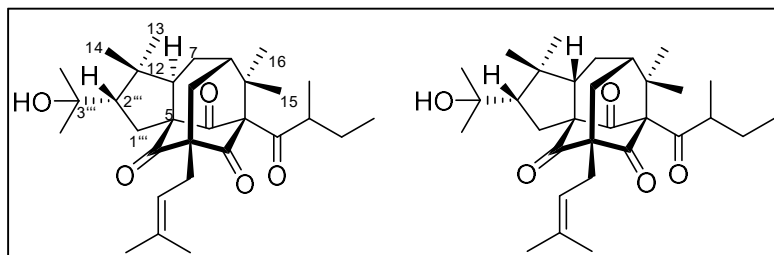
### Substanz 23

Die ESI-HRMS von Substanz **23** ergab eine Summenformel von C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub> (gefunden  $m/z$  499,3416 [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 499,3418). Die auffallende Übereinstimmung der NMR-Daten

von **22** und **23** und die Differenz von 14 Masseeinheiten ließen eine zusätzliche Methylengruppe in der Startersäure vermuten. Bestätigt wurden die 2-Methylbutyryl-Einheit und die gleichbleibende Stereochemie anhand der HMBC- und NOESY-Spektren. Die relative Stereochemie der beiden Verbindungen kann als  $1R^*$ ,  $3S^*$ ,  $4R^*$ ,  $6S^*$ ,  $8S^*$  und  $2''R^*$  zusammengefasst werden.

Verbindung **23** wurde als  $(2R^*, 3aR^*, 5S^*, 7R^*, 9S^*, 10aS^*)$ -2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)octahydro-4*H*-3a,7:5,9-dimethanocyclopenta[9]annulen-4,6,12(5*H*)-trion identifiziert. Da es sich um einen bisher nicht beschriebenen Naturstoff handelt, wird der Trivialname **Hirsutusal B** vergeben.

Strukturell sehr ähnliche Substanzen, allerdings mit einer aromatischen Acyleinheit wurden bereits vor 19 Jahren aus dem bereits häufiger erwähnten *H. sampsonii*, das der Sektion 9c *Sampsonia* angehört, isoliert (Hu und Sim 1999b, 2000; Zhang et al. 2016). Die beiden Derivate **Sampsonion F** und **G** unterscheiden sich lediglich in dem Substituenten an Position 3, der entweder eine Prenyl- (**F**) oder eine Geranylseitenkette (**G**) darstellt. Mittlerweile sind die beiden Vertreter auch für *H. attenuatum* aus Sektion 9 *Hypericum* (Li et al. 2015a) und für verschiedene Arten aus Sektion 3 *Ascyreia* (Liu et al. 2013b; Yang et al. 2015; Yang et al. 2017a) bekannt.

Abbildung 113 Strukturformeln der isolierten Substanzen **24** und **25**Tabelle 50  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen **24** und **25**; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                           |      | Substanz 24         |                                       | Substanz 25         |   |
|---------------------------|------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---|
| C/H                       |      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)         |
| Homoadamantan Grundgerüst | 1    | 86,0                |                                       | 85,2                |   |
|                           | 2    | 204,7               |                                       | 204,7               |   |
|                           | 3    | 68,6                |                                       | 67,1                |   |
|                           | 4    | 206,0               |                                       | 203,2               |   |
|                           | 5    | 73,3                |                                       | 70,8                |   |
|                           | 6    | 57,6                | 2,03 (1H, m)                          | 56,6                | 1,82 (1H, m)                                  |
|                           | 7    | 28,7                | a 1,57 (1H, m)<br>b 2,22 (1H, m)      | 22,5                | a 1,63 (1H, m)<br>b 1,91 (1H, m)              |
|                           | 8    | 43,7                | 2,02 (1H, m)                          | 42,0                | 1,99 (1H, m)                                  |
|                           | 9    | 50,0                |                                       | 47,2                |   |
|                           | 10   | 42,0                | a 1,77 (1H, m)<br>b 2,45 (1H, m)      | 35,0                | a 2,10 (1H, m)<br>b 2,37 (1H, dd, 6,6, -14,8) |
|                           | 11   | 203,4               |                                       | 202,6               |   |
|                           | 12   | 44,9                |                                       | 46,4                |   |
|                           | 13   | 27,3                | 0,89 (3H, s)                          | 17,4                | 1,05 (3H, s)                                  |
|                           | 14   | 28,4                | 1,21 (3H, s)                          | 29,6                | 1,11 (3H, s)                                  |
|                           | 15   | 22,6                | 1,28 (3H, s)                          | 22,4                | 1,26 (3H, s)                                  |
|                           | 16   | 25,2                | 1,30 (3H, s)                          | 25,1                | 1,26 (H, s)                                   |
| Acyl-Seitenkette          | 1'   | 207,6               |                                       | 207,1               |   |
|                           | 2'   | 49,8                | 1,74 (1H, m)                          | 49,5                | 1,64 (1H, m)                                  |
|                           | 3'   | 26,8                | a 1,31 (1H, m)<br>b 1,96 (1H, m)      | 26,5                | a 1,27 (1H, m)<br>b 1,76 (1H, m)              |
|                           | 4'   | 11,7                | 0,84 (3H, t, 7,5)                     | 11,5                | 0,80 (3H, t, 7,5)                             |
|                           | 5'   | 16,8                | 0,96 (3H, d, 6,4)                     | 16,9                | 1,04 (3H, d, 6,4)                             |
| Isopren I                 | 1''  | 29,6                | 2,51 (2H, m)                          | 29,0                | 2,55 (2H, m)                                  |
|                           | 2''  | 119,3               | 5,07 (1H, t, 6,9)                     | 118,8               | 5,24 (1H, t, 7,4)                             |
|                           | 3''  | 134,6               |                                       | 135,3               |   |
|                           | 4''  | 18,1                | 1,68 (3H, s)                          | 18,0                | 1,66 (3H, s)                                  |
|                           | 5''  | 26,0                | 1,69 (3H, s)                          | 26,1                | 1,74 (3H, s)                                  |
| Isopren II                | 1''' | 32,8                | a 2,11 (1H, m)<br>b 2,50 (1H, m)      | 29,9                | a 2,43 (1H, m)<br>b 2,65 (1H, m)              |
|                           | 2''' | 57,4                | 2,47 (1H, m)                          | 59,2                | 1,81 (1H, m)                                  |
|                           | 3''' | 73,4                |                                       | 72,8                |   |
|                           | 4''' | 30,4                | 1,39 (3H, m)                          | 30,6                | 1,40 (3H, s)                                  |
|                           | 5''' | 30,1                | 1,33 (3H, m)                          | 31,1                | 1,35 (3H, s)                                  |

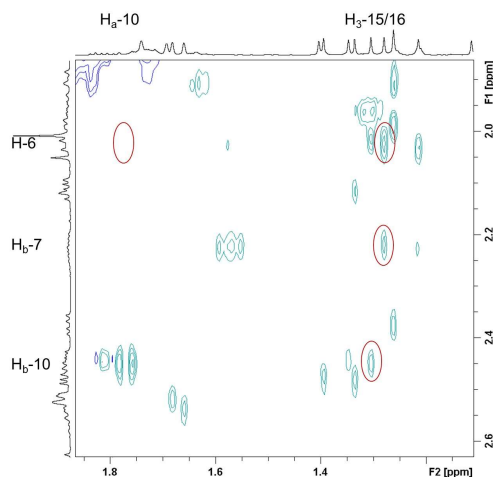
### Substanzen **24** und **25**

Die Substanzen **24** und **25** wurden als 1:1-Gemisch isoliert und ergaben im ESI-HRMS ein Pseudomolekülion mit  $m/z$  499,3420 (berechnet 499,3418), was für beide zur Summenformel  $C_{31}H_{46}O_5$  führt. Die Auswertung der NMR-Daten führte für beide Verbindungen zum gleichen Kohlenstoffskelett wie für **23**. Auffallend waren allerdings eine mehr oder weniger ausgeprägte Verschiebung einiger Kohlenstoffatome: allen voran C-7 ( $\delta_C$  24,6 ppm für **23**, 28,7 ppm für **24** sowie 22,5 ppm für **25**), C-10 ( $\delta_C$  35,1 ppm für **23**, 42,0 ppm für **24** sowie 35,0 ppm für **25**), C-13 und C-14 ( $\delta_C$  26,9 ppm und 27,4 ppm für **23**, 27,3 ppm und 28,4 ppm für **24** sowie 29,6 ppm und 17,4 ppm für **25**). Eine detaillierte Betrachtung der relativen Stereochemie an C-6 und C-2''' offenbarte konsequenterweise ebenfalls einige Unterschiede.

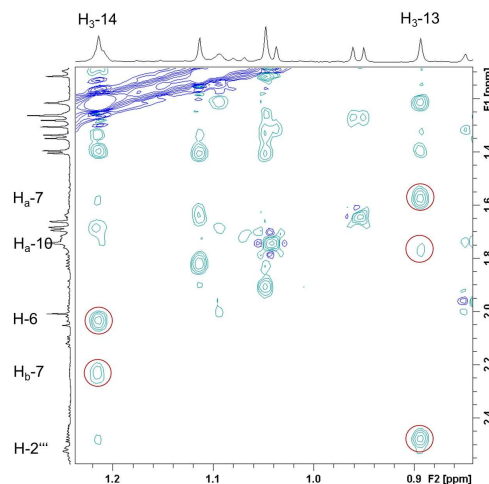
Für **24** zeigte das NOESY-Spektrum Korrelationen von H<sub>b</sub>-10 ( $\delta_H$  2,45 ppm) mit H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_H$  1,30 ppm), von H<sub>3</sub>-16 ( $\delta_H$  1,28 ppm) mit sowohl H<sub>b</sub>-7 ( $\delta_H$  2,22 ppm) als auch H-6 ( $\delta_H$  2,03 ppm) und kein Signal zwischen H-6 und H<sub>a</sub>-10 ( $\delta_H$  1,77 ppm), wodurch die  $\alpha$ -Position des Protons H-6 angezeigt wurde (**Abbildung 114, a**).

Die  $\beta$ -Orientierung von H-2''' ( $\delta_H$  2,47 ppm) konnte anhand von NOE-Effekten zwischen H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_H$  1,21 ppm) und den beiden Protonen H-6 und H<sub>b</sub>-7 und zwischen H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  0,89 ppm) und den Protonen H<sub>a</sub>-7 ( $\delta_H$  1,57 ppm), H<sub>a</sub>-10 und H-2''' ermittelt werden (**Abbildung 114, b**).

a

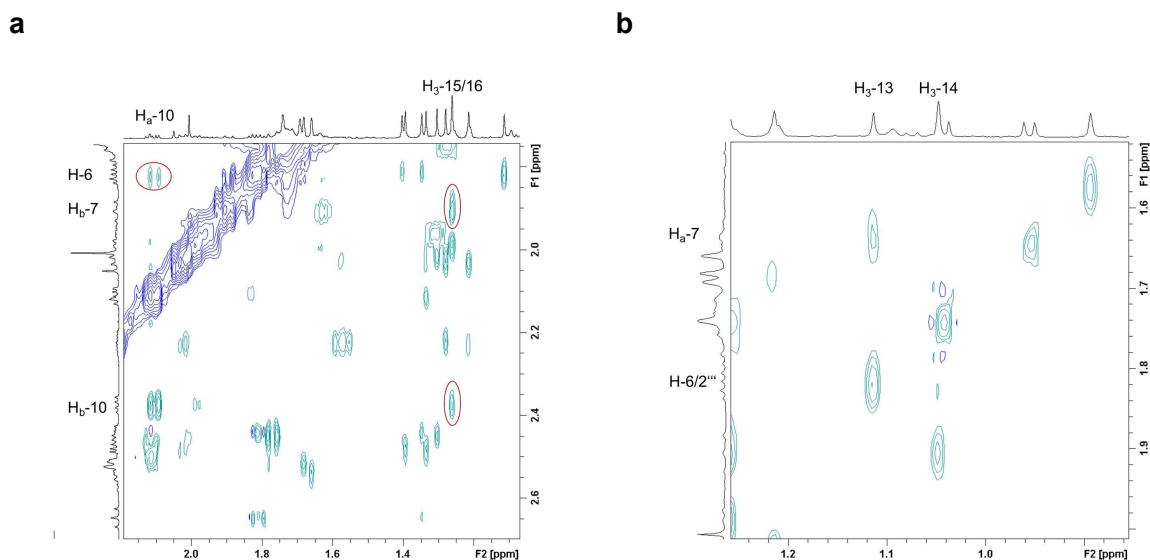


b



**Abbildung 114** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **24** mit Kreuzsignalen zwischen H<sub>b</sub>-10 und H<sub>3</sub>-15, H<sub>3</sub>-16 und sowohl H<sub>b</sub>-7 und H-6 und dem fehlenden Signal zwischen H<sub>a</sub>-10 und H-6 (**a**) und mit Signalen zwischen H<sub>3</sub>-14 und H-6 bzw. H<sub>b</sub>-7 und H<sub>3</sub>-13 und H<sub>a</sub>-7, H<sub>a</sub>-10 und H-2''' (**b**)

Für **25** konnte analog zu **23** die  $\beta$ -Positionierung von H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  1,82 ppm) festgestellt werden (**Abbildung 115, a**). Da sowohl H-6 als auch H-2'' ( $\delta_{\text{H}}$  1,81 ppm) und H<sub>a</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,63 ppm) im NOESY-Spektrum Signale mit H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,11 ppm) und nicht mit H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1,05 ppm) zeigten, müssen diese Protonen gleichgerichtet und damit  $\beta$ -orientiert sein (**Abbildung 115, b**).



**Abbildung 115** Ausschnitte aus dem NOESY-Spektrum von **25** mit Korrelationen von H<sub>b</sub>-10 zu H<sub>3</sub>-15, von H<sub>3</sub>-16 zu H<sub>b</sub>-7 und von H<sub>a</sub>-10 zu H-6 (**a**) und mit den Kreuzsignalen zwischen H<sub>3</sub>-13 und H<sub>a</sub>-7, H-6 und H-2'' (**b**)

Aufgrund der Datenlage kann für **24** die relative Stereochemie der Chiralitätszentren als 1*R*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup>, 5*R*<sup>\*</sup>, 6*R*<sup>\*</sup>, 8*S*<sup>\*</sup>, 2''*S*<sup>\*</sup> und für Substanz **25** als 1*R*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup>, 5*R*<sup>\*</sup>, 6*S*<sup>\*</sup>, 8*S*<sup>\*</sup>, 2''*S*<sup>\*</sup> angegeben werden.

Verbindung **24** konnte damit als (2*S*<sup>\*</sup>,3*aR*<sup>\*</sup>,5*S*<sup>\*</sup>,7*R*<sup>\*</sup>,9*S*<sup>\*</sup>,10*aR*<sup>\*</sup>)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)octahydro-4*H*-3a,7:5,9-dimethanocyclopenta[9]annulen-4,6,12(5*H*)-trion und **25** als (2*S*<sup>\*</sup>,3*aR*<sup>\*</sup>,5*S*<sup>\*</sup>,7*R*<sup>\*</sup>,9*S*<sup>\*</sup>,10*aS*<sup>\*</sup>)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1,1,8,8-tetramethyl-5-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(2-methylbutanoyl)octahydro-4*H*-3a,7:5,9-dimethanocyclopenta[9]annulen-4,6,12(5*H*)-trion identifiziert werden. Für die beiden in der Literatur bislang noch nicht beschriebenen Strukturen werden die Trivialnamen **Hirsutusal C** und **D** vergeben.

Bekannt sind bereits drei Strukturen, die dasselbe Grundgerüst und vor allem dieselben Konfigurationen an C-6 und C-2'' wie **24** aufweisen. **Sampsonion C** ist ein PPAP, welches wie der Name schon vermuten lässt das erste Mal aus *H. sampsonii* isoliert wurde (Hu und Sim 1999b, 2000; Zhang et al. 2016). Der Unterschied liegt wie so oft im Acylrest und der Substitution an C-3. Auch

für *H. attenuatum* (Li et al. 2015a) und *H. pseudohenryi* (Yang et al. 2017a) konnte die Verbindung nachgewiesen werden.

Das 3“-Peroxy-Derivat dazu wurde auch in *H. sampsonii* gefunden und erhielt den Trivialnamen **Hypersampsonon F** (Zhang et al. 2016).

Namensgebend für die vergleichbare Substanz **Plukenetion B**, allerdings abermals mit aromatischem Acylrest, ist die Isolierung aus *C. plukenetii* (Henry et al. 1999). Doch auch in verschiedenen *Hypericum*-Arten wurde die Komponente mittlerweile gefunden (Liu et al. 2013b; Tian et al. 2014a; Zhou et al. 2014; Zhang et al. 2016; Yang et al. 2017a).

Verwandte Substanzen zu **25** sind zum einen das **Hypercohon A**, isoliert aus *H. cohaerens* (Sektion 3 *Ascyreia*) (Liu et al. 2013b), zum anderen das **Attenuatumion D**, enthalten in *H. attenuatum* (Sektion 9 *Hypericum*) (Zhou et al. 2014).

Auch hier ist ein 3“-Peroxy-Derivat bekannt: **Hyperattenin I**, das ebenfalls in *H. attenuatum* gefunden wurde (Li et al. 2015a). Isoliert wurden diese Verbindungen auch aus *H. sampsonii* (Tian et al. 2014a; Zhang et al. 2016), *H. henryi* (Yang et al. 2015) und *H. pseudohenryi* (Yang et al. 2017a). Auch diese Substanzen zeichnen sich durch einen aromatischen Acylrest aus.

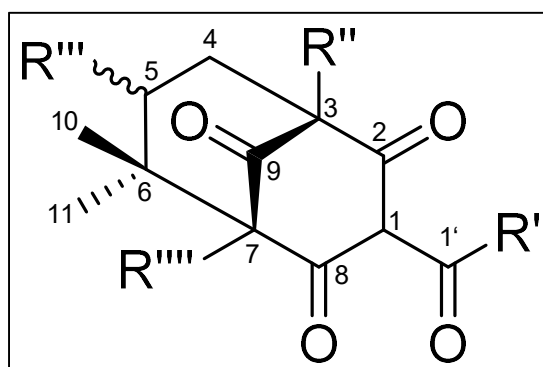
In der Literatur sind auch Verbindungen mit der letzten noch fehlenden Kombination der Konfigurationen, die hier nicht gefunden wurde, beschrieben. Dabei liegt sowohl an C-6 als auch C-2“ eine  $\alpha$ -Orientierung des Protons vor. **Hypersampsonon G** und **Hypersampson Q** wurden bereits in *Hypericum*-Arten aus den Sektionen 3 *Ascyreia* (Yang et al. 2017a) und 9c *Sampsonia* (Zhang et al. 2016; Zhu et al. 2016b; Tian et al. 2017) isoliert.

### 2.3.5 Acylphloroglucinole vom Typ-B I (Clusianon-Typ)

Die letzten beiden isolierten Acylphloroglucinole **26** und **27** leiten sich nicht mehr vom Hyperforin, sondern vom Clusianon ab. Damit gehören sie in die Gruppe der PPAPs vom B I-Typ. Bei diesem Typus liegt eine Prenylierung an C-3 vor und der Ringschluss erfolgt über das C-3 der Isopren-einheit mit dem C-5 des Phloroglucin-Grundkörpers.

#### 2.3.5.1 Identifizierung des gemeinsamen Grundgerüsts

Wie bei den vorhergehenden Acylphloroglucinolen befindet sich an C-1 der Acylrest. Alle weiteren Stellen können mannigfaltige Substitution aufweisen. Für folgende Substanzen kann damit der in **Abbildung 116** gezeigte Grundkörper angenommen werden.

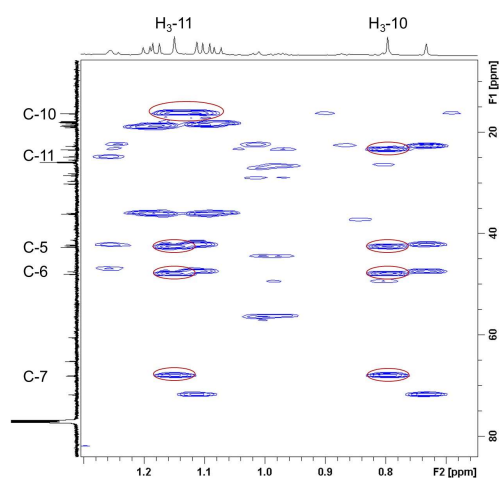


**Abbildung 116** Grundkörper der beiden Substanzen **26** und **27**: Acylphloroglucinole vom B I-Typ (Clusianon-Typ)

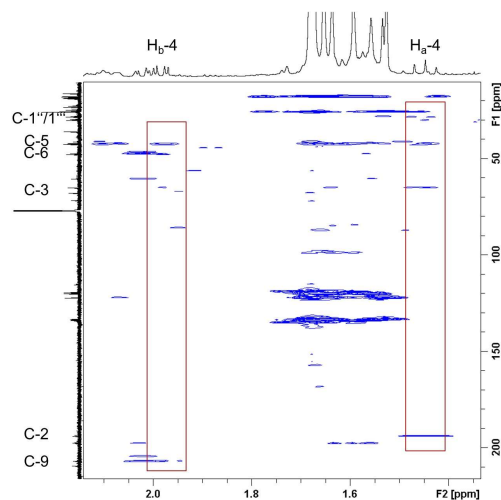
Zur Identifizierung des Skeletts führten zahlreiche HMBC-Korrelationen der H-Atome zu den jeweiligen benachbarten Kohlenstoffatomen. Ausgehend von den beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-10 und H<sub>3</sub>-11 waren im HMBC-Spektrum Korrelationen zu C-5, C-6, C-7 und entweder C-10 oder C-11 zu sehen (**Abbildung 117, a**). In **Abbildung 117 (b)** sind die Kreuzsignale der Methylen-Gruppe H<sub>2</sub>-4 zu C-3, C-5, C-6 und C-8 des Grundgerüsts und zu den beiden Methylen-Kohlenstoffatomen der Isoprenreste C-1'' und C-1''' gezeigt.



a



b

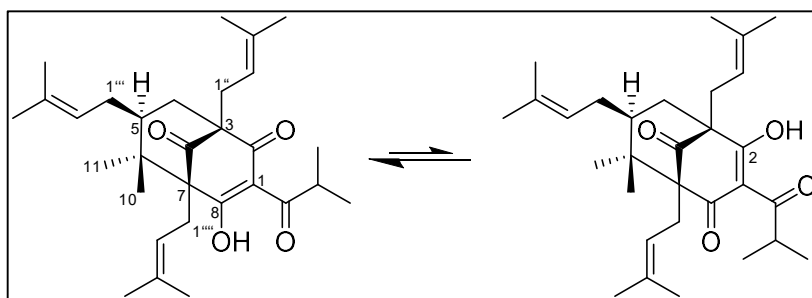


**Abbildung 117** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **26a** mit Korrelationen der Methylgruppen H<sub>3</sub>-10 und H<sub>3</sub>-11 zu C-5, C-6, C-7 und C-10 oder C-11 (a) und Kreuzsignale der Methylenprotonen H<sub>2</sub>-4 und C-2, C-3, C-5, C-6, C-9, C-1'' und C-1''' (b)

Bereits aus **Kapitel 2.3.1**, S. 91 bekannte HMBC-Korrelationen, die zum einen die Acyluntereinheit, zum anderen die Isoprenreste und ihre Verknüpfung identifizieren, waren auch hier zu finden.

Die relative Stereochemie der beiden Chiralitätszentren C-3 und C-7 wird durch das starre, bicyclische Grundgerüst festgelegt. Alle anderen wurden mithilfe der NOESY-Daten und Literaturwerten bestimmt.

## 2.3.5.2 Substanzen 26 und 27

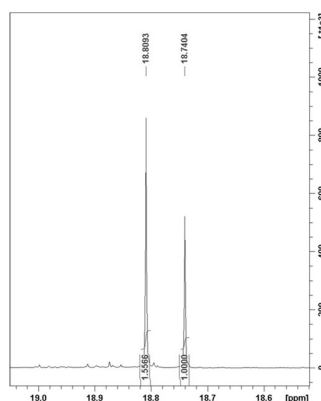
Abbildung 118 Strukturformeln der isolierten Substanzen **26a** und **26b** (3:2)Tabelle 51  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen **26a** und **26b**; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

|                                       |       | Substanz 26a        |                                       | Substanz 26b        |                                       |
|---------------------------------------|-------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
|                                       |       | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz) |
| Typ-B1-Acylphloroglucinol-Grundgerüst | 1     | 115,6               |                                       | 115,0               |                                       |
|                                       | 2     | 194,1               |                                       | 197,8               |                                       |
|                                       | 3     | 65,2                |                                       | 60,5                |                                       |
|                                       | 4     | 42,4                | a 1,45 (1H, m)<br>b 1,98 (1H, m)      | 41,2                | 2,02 (2H, m)                          |
|                                       | 5     | 42,6                | 1,59 (1H, m)                          | 42,2                | 1,56 (1H, m)                          |
|                                       | 6     | 48,0                |                                       | 47,5                |                                       |
|                                       | 7     | 68,0                |                                       | 71,8                |                                       |
|                                       | 8     | 197,4               |                                       | 193,4               |                                       |
|                                       | 9     | 207,0               |                                       | 207,2               |                                       |
|                                       | 10    | 16,3                | 0,80 (3H, s)                          | 16,3                | 0,73 (3H, s)                          |
|                                       | 11    | 23,4                | 1,15 (3H, s)                          | 22,8                | 1,11 (H, s)                           |
| Acyl-Seitenkette                      | 1'    | 209,5               |                                       | 209,4               |                                       |
|                                       | 2'    | 36,1                | 4,05 (1H, sept, 6,8)                  | 36,0                | 4,05 (1H, sept, 6,8)                  |
|                                       | 3'    | 18,6                | 1,10 (3H, s)                          | 18,3                | 1,19 (3H, s)                          |
|                                       | 4'    | 18,8                | 1,18 (3H, s)                          | 19,0                | 1,08 (3H, s)                          |
| Isopren I                             | 1''   | 30,2                | 2,49 (2H, m)                          | 29,6                | 2,55 (2H, m)                          |
|                                       | 2''   | 120,1               | 5,02 (1H, t, 4,9)                     | 119,5               | 5,11 (1H, t, 6,9)                     |
|                                       | 3''   | 133,8               |                                       | 134,3               |                                       |
|                                       | 4''   | 18,0                | 1,68 (3H, s)                          | 18,0                | 1,68 (3H, s)                          |
|                                       | 5''   | 15,9                | 1,56 (3H, s)                          | 25,9                | 1,59 (3H, s)                          |
| Isopren II                            | 1'''  | 28,5                | 2,08 (2H, m)                          | 28,2                | a 1,66 (1H, m)<br>b 2,11 (1H, m)      |
|                                       | 2'''  | 122,2               | 4,92 (1H, m)                          | 122,3               | 4,94 (1H, m)                          |
|                                       | 3'''  | 133,4               |                                       | 133,3               |                                       |
|                                       | 4'''  | 17,9                | 1,53 (3H, s)                          | 17,9                | 1,53 (3H, s)                          |
|                                       | 5'''  | 25,8                | 1,65 (3H, s)                          | 25,8                | 1,63 (3H, s)                          |
| Isopren III                           | 1'''' | 24,9                | 2,65 (2H, m)                          | 25,4                | a 2,46 (1H, m)<br>b 2,68 (1H, m)      |
|                                       | 2'''' | 119,5               | 4,71 (1H, m)                          | 120,3               | 4,71 (1H, m)                          |
|                                       | 3'''' | 134,0               |                                       | 133,7               |                                       |
|                                       | 4'''' | 18,1                | 1,68 (3H, s)                          | 18,1                | 1,68 (3H, s)                          |
|                                       | 5'''' | 25,9                | 1,59 (3H, s)                          | 25,9                | 1,56 (3H, s)                          |
| 8-OH                                  |       |                     | 18,81 (1H, s)                         | 2-OH                | 18,74 (1H, s)                         |

### Substanz 26

Für Substanz **26** wurde im ESI-HRMS ein Pseudomolekülion bei  $m/z$  469,3307  $[M+H]^+$  (berechnet 469,3312) gefunden, welches zur Berechnung der Summenformel  $C_{30}H_{44}O_4$  diente. Im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum waren 60 Kohlenstoffatome zu sehen, die jeweils paarweise vorlagen. Dies führte zur Annahme, dass die isolierte Substanz zwei tautomere Strukturformeln (**26a** und **26b**) besitzt. Von den jeweils 30 C-Atomen konnten nach Auswertung der HSQC-Daten elf als quartär, fünf als tertiär, vier als sekundär und zehn als primär beschrieben werden.

Auch im  $^1H$ -NMR-Spektrum konnten alle Signale doppelt und nur leicht verschoben detektiert werden, so auch zum ersten Mal ein sehr stark tieffeldverschobenes H-Atom ( $\delta_H$  18,81 ppm für **26a** und 18,74 ppm für **26b**), das für das Vorhandensein einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Acylseitenkette und dem Phloroglucinring spricht. Aus dem Verhältnis der Signalintensitäten konnte auf das Verteilungsverhältnis der Substanzen geschlossen werden, wobei Tautomer **26a** bevorzugt vorlag.



**Abbildung 119** Ausschnitt aus dem  $^1H$ -NMR-Spektrum von **26** mit den integrierten Signalen der tieffeldverschobenen Protonen

Des Weiteren wurden im Protonenspektrum drei olefinische H-Atome ( $\delta_H$  5,02, 4,92 und 4,71 ppm für **26a**;  $\delta_H$  5,11, 4,94 und 4,71 ppm für **26b**) detektiert, denen jeweils anhand der HMBC-Daten ein Isoprenrest zugeordnet werden konnte. Die Methylengruppen  $H_{2-1''}$  ( $\delta_H$  2,49 ppm für **26a** und  $\delta_H$  2,55 ppm für **26b**) und  $H_{2-1'''}$  ( $\delta_H$  2,65 ppm für **26a** sowie 2,46 und  $\delta_H$  2,68 ppm für **26b**) korrelierten mit den tieffeldverschobenen Kohlenstoffatomen C-2 ( $\delta_C$  194,1 ppm für **26a** und  $\delta_C$  197,8 ppm für **26b**) beziehungsweise C-8 ( $\delta_C$  197,4 ppm für **26a** und  $\delta_C$  193,4 ppm für **26b**) und

C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  207,0 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  207,2 ppm für **26b**) und zeigten so die Verknüpfungen an den Phloroglucinring in den Positionen 3 ( $\delta_{\text{C}}$  65,2 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  60,5 ppm für **26b**) und 7 ( $\delta_{\text{C}}$  68,0 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  71,8 ppm für **26b**) an. Der dritte Isoprenrest konnte aufgrund seiner HMBC-Signale von H<sub>2</sub>-1''' ( $\delta_{\text{H}}$  2,08 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{H}}$  1,66 und 2,11 ppm für **26b**) zu C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  42,4 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  41,2 ppm für **26b**), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  42,6 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  42,2 ppm für **26b**) und C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,0 ppm für **26a** und  $\delta_{\text{C}}$  47,5 ppm für **26b**) an Position 5 des Typ B1 Acylphloroglucinol-Grundkörpers zugeordnet werden.

Ein Unterschied zwischen **26a** und **26b** wurde bei der Analyse der HMBC-Korrelationen ausgehend von der Hydroxygruppe ersichtlich. Bei **26a** koppelte das H-Atom mit dem quartären Kohlenstoffatom C-7, wohingegen das entsprechende Proton von **26b** ein Kreuzsignal mit dem quartären C-Atom C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  60,5 ppm) aufwies. Die daraus resultierenden Veränderungen der chemischen Verschiebungen, vor allem der Kohlenstoffatome C-2, C-3, C-7 und C-8 konnten anhand des sehr ähnlichen **Clusianons** nachvollzogen werden.

**Clusianon** wurde bereits 1976 aus den Wurzeln der *Clusia congestiflora* (Clusiaceae) isoliert, wobei die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt und die äquatoriale Orientierung der Isopreneinheit an C-5 festgelegt wurde (McCandlish et al. 1976). Erst 1991 wurden das erste Mal NMR-Daten der Verbindung veröffentlicht, allerdings ohne dabei auf die Konfiguration an C-5 einzugehen (Monache et al. 1991). De Oliveira et al. (1996) isolierten schließlich abermals **Clusianon** aus einer *Clusia*-Art (*Clusia spiritu-sanctensis*) und bestätigten die Struktur mithilfe der Röntgenstrukturanalyse, allerdings konnten Abweichungen zu den bereits publizierten NMR-Werten festgestellt werden. Als Santos et al. (1998) das **5-epi-Clusianon** aus *Rheedia gardneriana* (Clusiaceae) isolierten und die axiale Stellung des Prenylrest abermals mithilfe der Kristallstruktur festlegten, wurde beim Vergleich der NMR-Daten deutlich, dass es sich bei der von Monache et al. gefundenen Verbindung auch um das C-5 Epimer von **Clusianon** handeln muss (dos Santos et al. 2001).

Piccinelli et al. (2005) gelang es erstmals die tautomeren Paare von **Clusianon** und **5-epi-Clusianon** aus einer Pflanze zu isolieren. In ihrer Arbeit gingen sie vor allem auf die relative Konfiguration des Stereozentrums C-5 ein. Der Vergleich zeigte, dass bei einer  $\alpha$ -Stellung des Protons die Verschiebung des Kohlenstoffatoms bei  $\delta_{\text{C}}$  ~42 ppm liegt, indessen befindet sich bei  $\beta$ -Orientierung des Protons das C-Atom bei  $\delta_{\text{C}}$  ~46 ppm. In den hier isolierten Tautomeren konnte die Lage des C-5 bei  $\delta_{\text{C}}$  42,6 ppm (**26a**) und 42,2 ppm (**26b**) detektiert und somit das gebundene Proton als  $\alpha$ -konfiguriert beschrieben werden.

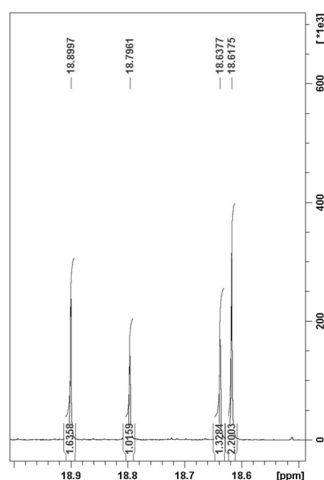
Die beiden tautomeren Verbindungen konnten als (1*S*\*,5*S*\*,7*S*\*)-4-Hydroxy-3-isobutyryl-6,6-dimethyl-1,5,7-tris(3-methylbut-2-en-1-yl)bicyclo[3.3.1]non-3-en-2,9-dion bzw. (1*R*\*,5*R*\*,7*S*\*)-4-Hydroxy-3-isobutyryl-8,8-dimethyl-1,5,7-tris(3-methylbut-2-en-1-yl)bicyclo[3.3.1]non-3-en-2,9-dion identifiziert werden. Der bisher nicht beschriebene Naturstoff erhält den Trivialnamen **Hyperhirsum A**.

**Clusianon**, **5-*epi*-Clusianon** und am Aromaten hydroxylierte bzw. acetoxylierte Derivate wurden außerdem bereits in *H. hypericoides* (Sektion 20 *Myriandra*) gefunden (Christian et al. 2008). Daneben gelang die Isolierung des **Clusianons** aus *H. sampsonii* (Hu und Sim 2000; Xiao et al. 2007) und die des **5-*epi*-Clusianons** aus *H. elegans* (Sektion 9 *Hypericum*) (Nedialkov et al. 2011; Zheleva-Dimitrova et al. 2013) und *H. scabrum* (Sektion 17 *Hirtella*) (Tanaka et al. 2004). Auch der 5-*epi*-Clusianon Abkömmling **Hyperibone L** wurde aus *H. scabrum* (Tanaka et al. 2004) gewonnen. Andere in der Literatur für die Gattung *Hypericum* beschriebenen bizyklischen Acylphloroglucinole vom B1 Typ sind **Hyperpapuanon** (Winkelmann et al. 2001b) und **Hyperatomarin** (Savikin-Fodulović et al. 2003; Momekov et al. 2008), wobei ersteres sich vom 5-*epi*-Clusianon, letzteres vom Clusianon ableitet.

### Substanz 27

Das ESI-HRMS-Spektrum von Substanz **27** ergab ein positives Pseudomolekülion mit  $m/z$  483,3469  $[M+H]^+$  (berechnet 483,3469), woraus sich die Summenformel  $C_{31}H_{46}O_4$  ableiten ließ.

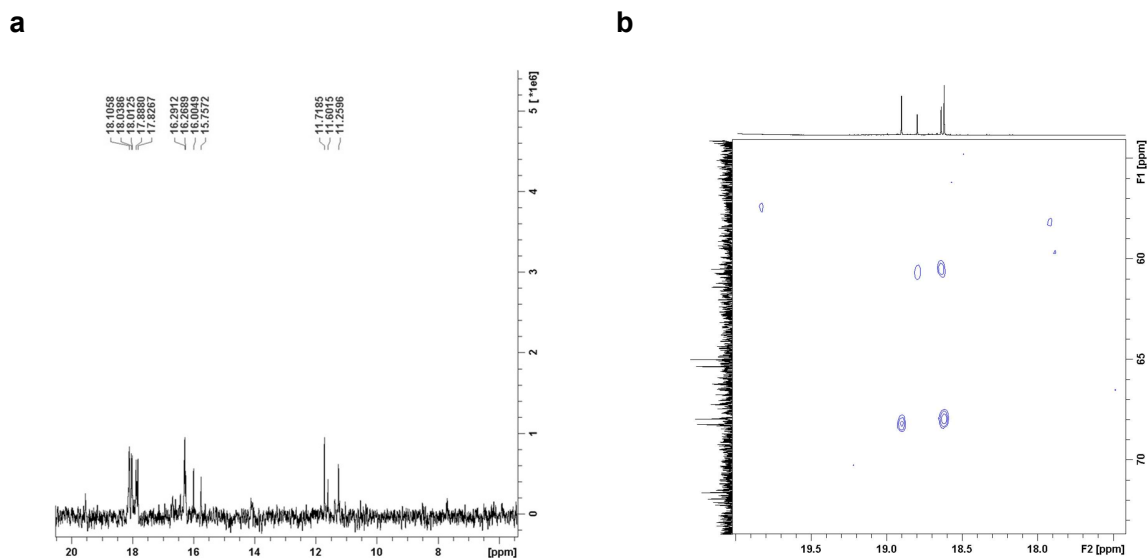
Auch für **27** sind im  $^1H$ -NMR-Spektrum tieffeldverschobene Protonen zu finden. Allerdings nicht nur zwei, die für ein Tautomerenpaar wie Substanz **26** sprechen würden, sondern vier.



**Abbildung 120** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **27** mit den integrierten Signalen der tieffeldverschobenen Protonen

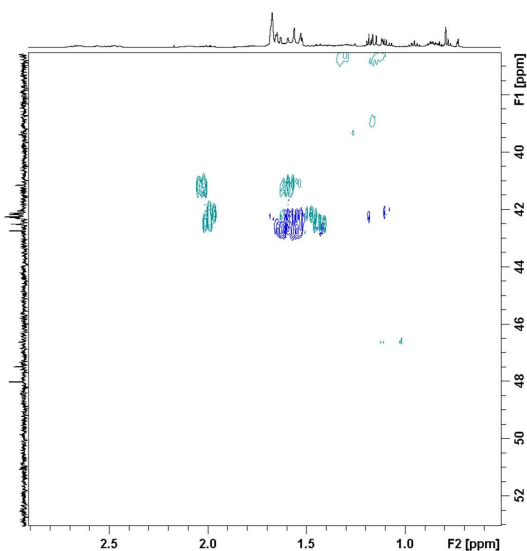
Da sich die NMR-Daten von **26** und **27** sehr ähneln, die MS-Daten einen Unterschied von 14 Masseeinheiten ergeben und das Verhalten auf der DC-Platte gleich ist, ist auch hier ein tautomeres Paar jedoch mit einem 2-Methylbutyrylrest als Startersäure denkbar. Zusätzlich könnte ein zweites tautomeres Paar enthalten sein, das vergleichbar mit dem **5-*epi*-Clusianon** an C-5 eine abweichende Konfiguration aufweist. Eine genaue Zuordnung der Signale ist jedoch aufgrund der zahlreichen überlappenden Signale im vorliegenden Fall nicht mehr möglich.

Für die Vermutung der abgewandelten Startersäure sprachen die Anwesenheit von Kohlenstoffatomen, die eine chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} \sim 11$  ppm aufweisen (**Abbildung 121, a**). Ein charakteristisches Triplett und ein Dublett im Hochfeld des Protonenspektrums war allerdings nicht eindeutig auszumachen. Dass zwei Tautomerenpaare ähnlich dem von **26** vorliegen, deuteten die HMBC-Korrelationen der tieffeldverschobenen Protonen zu je zwei C-Atomen mit  $\delta_{\text{C}} \sim 60$  und 68 ppm an (**Abbildung 121, b**).



**Abbildung 121** Ausschnitt aus dem  $^{13}\text{C}$ -Spektrum von **27** (a) und Ausschnitt aus dem HMBC-Spektrum von **27** mit Kreuzsignalen der tieffeldverschobenen Protonen (b)

Läge beim zweiten Paar eine Konfiguration analog der des **5-*epi*-Clusianons** vor, würde man für C-5 ein Methin-Kohlenstoffatom mit  $\delta_{\text{C}} \sim 46$  ppm erwarten, welches im HSQC-Spektrum jedoch nicht zu detektieren war (**Abbildung 122**). Worin genau der Unterschied der beiden Paare besteht, ist anhand der hier ermittelten Daten nicht eindeutig auszumachen.



**Abbildung 122** Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum von **27** mit fehlenden Signalen von Methin-Kohlenstoffatomen bei  $\delta_{\text{C}} \sim 46$  ppm

Zwei der insgesamt vier Verbindungen konnten als tautomeres Paar ( $1S^*,5S^*,7S^*$ )-4-Hydroxy-3-(2-methylbutanoyl)-6,6-dimethyl-1,5,7-tris(3-methylbut-2-en-1-yl)bicyclo[3.3.1]non-3-en-2,9-dion und ( $1R^*,5R^*,7S^*$ )-4-Hydroxy-3-(2-methylbutanoyl)-8,8-dimethyl-1,5,7-tris(3-methylbut-2-en-1-yl)bicyclo[3.3.1]non-3-en-2,9-dion identifiziert werden. Der bisher nicht beschriebene Naturstoff erhält den Trivialnamen **Hyperihirsum B**.



## 2.3.6 Weitere Substanzen

### 2.3.6.1 Substanzen 28 und 29

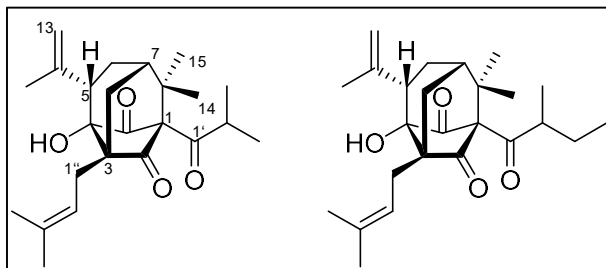


Abbildung 123 Strukturformeln der isolierten Substanzen **28** und **29**

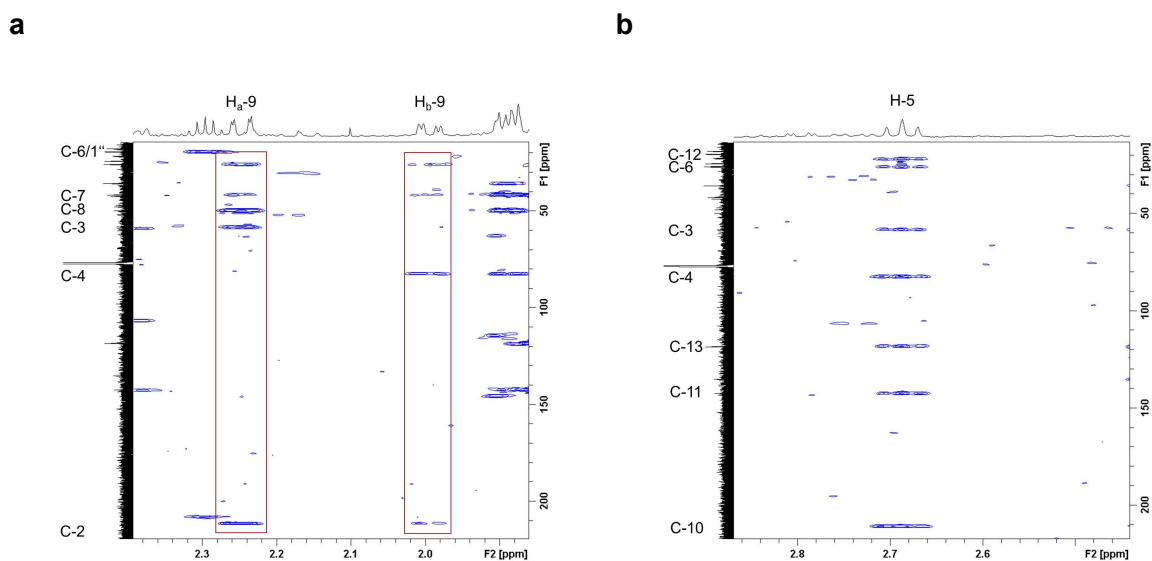
Tabelle 52  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Substanzen **28** und **29**; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$

|                  | Substanz 28 |                     |  | Substanz 29         |  |  |
|------------------|-------------|---------------------|--|---------------------|--|--|
|                  | C/H         | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                      | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)                      |  |
| Grundgerüst      | 1           | 85,4                |  | 85,2                |  |  |
|                  | 2           | 211,5               |  | 211,5               |  |  |
|                  | 3           | 58,4                |  | 58,1                |  |  |
|                  | 4           | 82,5                |  | 82,4                |  |  |
|                  | 5           | 41,9                | 2,69 (1H, t, 9,9)  | 41,9                | 2,68 (1H, t, 10,1)   |  |
|                  | 6           | 26,1                | 1,89 (2H, m)   | 26,1                | 1,89 (2H, m)   |  |
|                  | 7           | 40,7                | 1,70 (1H, m)   | 41,6                | 1,70 (1H, m)   |  |
|                  | 8           | 49,8                |  | 50,1                |  |  |
|                  | 9           | 35,7                | a 1,99 (1H, dd, 3,8, -13,9)<br>b 2,25 (1H, dd, 2,0, -13,8) | 35,8                | a 1,99 (1H, dd, 3,8, -13,9)<br>b 2,24 (1H, dd, 1,8, -13,9) |  |
|                  | 10          | 210,9               |  | 210,8               |  |  |
|                  | 11          | 142,5               |  | 142,5               |  |  |
|                  | 12          | 21,9                | 1,85 (3H, s)   | 21,9                | 1,86 (3H, s)   |  |
|                  | 13          | 118,2               | a 4,95 (1H, s)<br>b 5,25 (1H, s)                           | 118,2               | a 4,96 (1H, s)<br>b 5,25 (1H, s)                           |  |
|                  | 14          | 21,8                | 1,22 (3H, s)   | 21,9                | 1,23 (3H, s)   |  |
|                  | 15          | 24,4                | 1,28 (3H, s)   | 24,5                | 1,28 (3H, s)   |  |
| Acyl-Seitenkette | 1'          | 208,2               |  | 207,7               |  |  |
|                  | 2'          | 42,5                | 2,30 (1H, sept, 6,7)                                       | 49,0                | 2,10 (1H, m)   |  |
|                  | 3'          | 19,5                | 1,08 (3H, d, 6,5)  | 25,7                | a 1,25 (1H, m)<br>b 1,83 (1H, m)                           |  |
|                  | 4'          | 19,7                | 1,03 (3H, d, 6,6)  | 11,4                | 0,85 (3H, t, 7,4)  |  |
|                  | 5'          |                     |  | 15,4                | 1,03 (3H, d, 6,6)  |  |
| Isopren I        | 1''         | 25,9                | 2,42 (2H, d, 7,9)  | 25,9                | 2,41 (2H, d, 7,9)  |  |
|                  | 2''         | 118,5               | 5,31 (1H, t, 7,9)  | 118,6               | 5,31 (1H, t, 7,9)  |  |
|                  | 3''         | 135,2               |  | 135,2               |  |  |
|                  | 4''         | 18,0                | 1,66 (3H, s)   | 18,0                | 1,66 (3H, s)   |  |
|                  | 5''         | 26,2                | 1,76 (3H, s)   | 26,2                | 1,76 (3H, s)   |  |

**Substanz 28**

Substanz **28** hat eine Summenformel von  $C_{24}H_{34}O_4$ , welche sich anhand des ESI-HRMS auf Basis des Pseudomoleküls mit  $m/z$  409,2348  $[M+Na]^+$  (berechnet 409,2349) ableitet. Die 24 Kohlenstoffatome teilen sich anhand der HSQC-Daten in neun quartäre C-Atome, vier Methin-, vier Methylen- und sieben Methylgruppen auf.

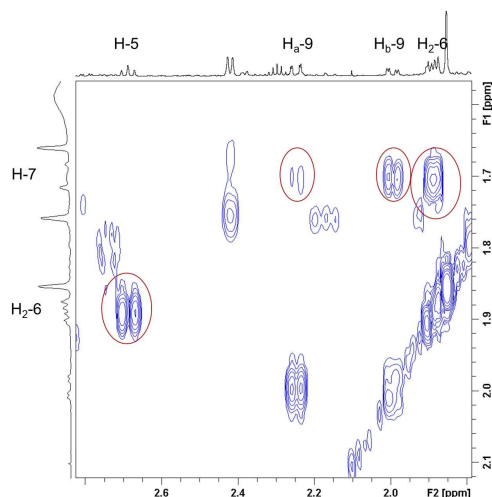
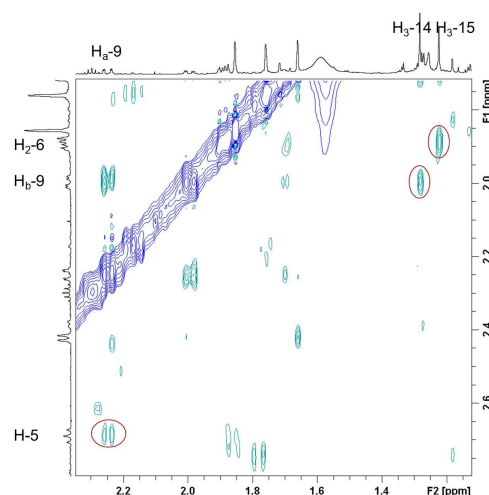
Auch bei dieser Substanz konnten die für Acylphloroglucinole charakteristischen Elemente detektiert werden: Sowohl ein Isoprenrest (C-1'' bis C-5''), dessen Methylengruppe H<sub>2</sub>-1'' ( $\delta_H$  2,42 ppm) HMBC-Korrelationen zu C-2 ( $\delta_C$  211,5 ppm), C-3 ( $\delta_C$  58,4 ppm), C-4 ( $\delta_C$  82,5 ppm) und C-9 ( $\delta_C$  35,7 ppm) aufwies, als auch ein Acylrest, der hier als Isobutyryl-Einheit vorliegt. Im  $^{13}C$ -Spektrum wurden nur drei Carbonyl-Kohlenstoffatome (C-2, C-10 und C-1') und auch keine charakteristische Verschiebung für eine Hemiketalstruktur gefunden. Auffällig waren die C-Atome einer weiteren Doppelbindung C-11 ( $\delta_C$  142,5 ppm) und C-13 ( $\delta_C$  118,2 ppm), die endständig sein muss, da es sich bei C-13 um eine Methylengruppe ( $\delta_H$  4,95 und 5,25 ppm) handelt.



**Abbildung 124** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **28** mit Kreuzsignalen der Methylengruppe H<sub>2</sub>-9 und C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, C-8 und C-1'' (a) und von H-5 zu C-3, C-4, C-6, C-10, C-11, C-12 und C-13 (b)

Die Protonen H<sub>2</sub>-13 ( $\delta_H$  4,95 und 5,25 ppm) lieferten HMBC-Kreuzsignale zu C-5 ( $\delta_C$  41,9 ppm) und C-12 ( $\delta_C$  21,9 ppm). Korrelationen zwischen H<sub>2</sub>-9 ( $\delta_H$  1,99 und 2,25 ppm) und C-2, C-3, C-4, C-6 ( $\delta_C$  26,1 ppm), C-7 ( $\delta_C$  40,6 ppm), C-8 ( $\delta_C$  49,8 ppm) und C-1'' ( $\delta_C$  25,9 ppm) (**Abbildung 124, a**), zwischen H-5 ( $\delta_H$  2,69 ppm) und C-3, C-4, C-6, C-10 ( $\delta_C$  210,9 ppm), C-11, C-12 ( $\delta_C$

21,9 ppm) und C-13 (**Abbildung 124, b**) und auch zwischen den beiden geminalen Methylgruppen H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1,28 ppm) und H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,22 ppm) und C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  85,4 ppm), C-7 und C-8 offenbarten das trizyklische Grundgerüst der isolierten Substanz. Überdies wurde die Struktur durch die im COSY-Spektrum ermittelte Protonenkette H-5, H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_{\text{H}}$  1,89 ppm), H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,70 ppm) und H<sub>2</sub>-9 bestätigt (**Abbildung 125, a**).

**a****b**

**Abbildung 125** Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von **28** mit Korrelationen von H<sub>2</sub>-9, H-7, H<sub>2</sub>-6 mit H-5 (**a**) und Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum mit Kreuzsignalen zwischen H<sub>b</sub>-9 und H<sub>3</sub>-14, zwischen H<sub>3</sub>-15 und H<sub>2</sub>-6 und zwischen H-5 und H<sub>a</sub>-9 (**b**)

Die Position des Protons H-5 ließ sich mithilfe des NOESY-Experiments als  $\beta$ -orientiert bestimmen. Es zeigten sich Kreuzsignale H<sub>b</sub>-9 und H<sub>3</sub>-14, H<sub>3</sub>-15 und H<sub>2</sub>-6 und deutlich H<sub>a</sub>-9 und H-5 (**Abbildung 125, b**). Damit ergibt sich für das trizyklische Grundgerüst die relative Konfiguration 1*R*<sup>\*</sup>, 3*S*<sup>\*</sup>, 4*S*<sup>\*</sup>, 5*S*<sup>\*</sup> und 7*S*<sup>\*</sup>.

Bei der Verbindung handelt es sich um (2*R*<sup>\*</sup>,3*aS*<sup>\*</sup>,5*S*<sup>\*</sup>,7*S*<sup>\*</sup>,7*aS*<sup>\*</sup>)-7*a*-Hydroxy-2-isobutyryl-8,8-dimethyl-3*a*-(3-methylbut-2-en-1-yl)-7-(prop-1-en-2-yl)hexahydro-1*H*-2,5-methanoiden-1,3(2*H*)-dion, welches Trivialnamen **Hyperihirsuzerol A** erhält. Es ist ein bisher nicht beschriebener Naturstoff.

**Substanz 29**

Substanz **29** ergab im ESI-HRMS ein pseudomolekulares Ion mit  $m/z$  401,2689  $[M+H]^+$  (berechnet 401,2686), woraus sich die Summenformel  $C_{25}H_{36}O_4$  berechnen lässt.

Die Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Daten zeigte, dass es sich bei **29** um die gleiche Struktur wie bei **28** mit lediglich einer zusätzlichen Methylengruppe in der Startersäure handelte. Auch die Stereochemie konnte anhand entsprechender NOESY-Signale analog **28** festgelegt werden.

Verbindung **29** konnte als (2*R*\*,3*aS*\*,5*S*\*,7*S*\*,7*aS*\*)-7*a*-Hydroxy-8,8-dimethyl-3*a*-(3-methylbut-2-en-1-yl)-2-(2-methylbutanoyl)-7-(prop-1-en-2-yl)hexahydro-1*H*-2,5-methanoinden-1,3(2*H*)-dion identifiziert werden und wird entsprechend **28** als **Hyperihirsuzerol B** bezeichnet. Auch dabei handelt es sich um einen bislang unbekannten Sekundärmetaboliten.

In der Literatur wird eine vergleichbare Substanz für einen in Südamerika beheimateten Baum aus der Familie der Clusiaceae (*Kielmeyera lathrophyton*) beschrieben (de Almeida et al. 2011). Die **Lathrophytoische Säure A** weist lediglich Unterschiede in der Acylfunktion auf. Bei **Hypatulin A**, das aus *H. patulum* (Sektion 3 *Ascyreia*) isoliert wurde, handelt es sich ebenfalls um ein trizyklisches Acylphloroglucinol mit einem fünfgliedrigen Grundring. Die zahlreichen Isoprensubstituenten wurden allerdings andersartig verknüpft (Tanaka et al. 2016). Auch in einer *Garcinia*-Art konnte eine verwandte Substanz gefunden werden (Weng et al. 2003). **Garciniellipton G** besitzt eine bizyklische Struktur und den charakteristischen Cyclopentan-Grundkörper mit zwei Carbonyl- und einer Alkoholfunktion.

## 2.3.6.2 Substanz 30

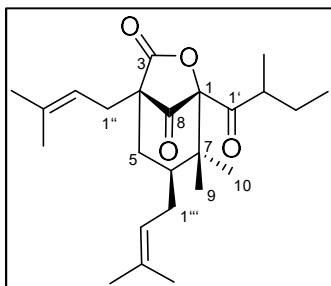


Abbildung 126 Strukturformel der isolierten Substanz 30

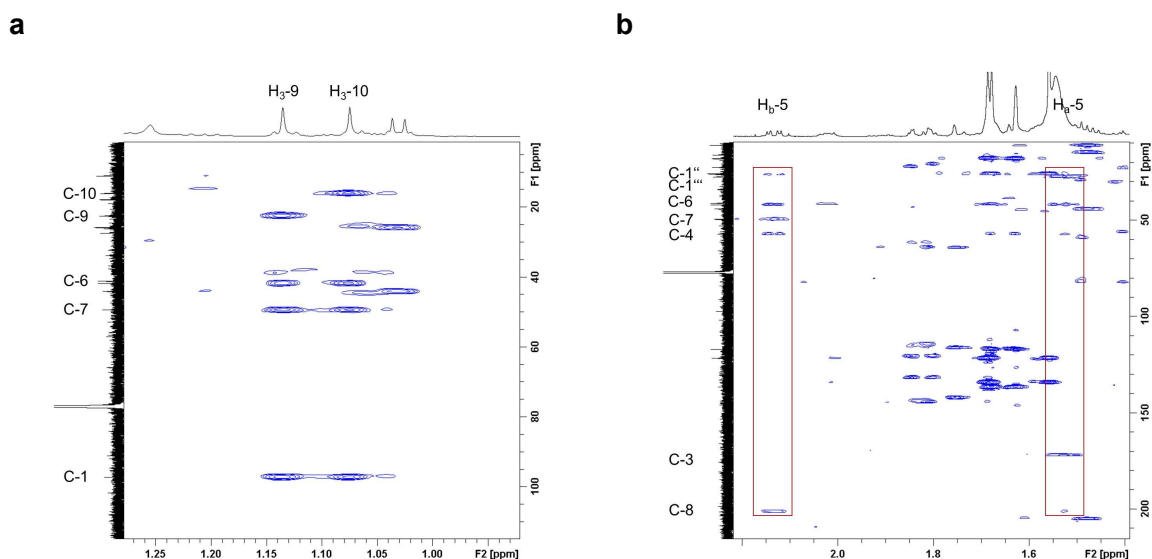
Tabelle 53  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von Substanz 30; 600 MHz ( $^1\text{H}$ ) und 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), 298 K, in  $\text{CDCl}_3$ 

| Substanz 30      |      |  |
|------------------|------|--|
|                  | C/H  | $\delta_{\text{C}}$ $\delta_{\text{H}}$ (mult, $J$ in Hz)          |
| Grundgerüst      | 1    | 97,3   |
|                  | 3    | 172,0  |
|                  | 4    | 57,0   |
|                  | 5    | a 2,13 (1H, dd, 4,5, -13,3)<br>b 1,52 (1H, m)                      |
|                  | 6    | 41,8    1,68 (1H, m)   |
|                  | 7    | 49,4   |
|                  | 8    | 201,2  |
|                  | 9    | 22,5    1,07 (3H, s)   |
|                  | 10   | 16,1    1,14 (3H, s)   |
| Acyl-Seitenkette | 1'   | 205,2  |
|                  | 2'   | 44,0    2,90 (1H, sext, 6,9)                                       |
|                  | 3'   | 25,9    a 1,21 (1H, m)<br>b 1,47 (1H, m)                           |
|                  | 4'   | 11,1    0,74 (3H, t, 7,4)  |
|                  | 5'   | 14,9    1,03 (3H, d, 6,8)  |
| Isopren I        | 1''  | 26,2    a 2,36 (1H, dd, 7,5, -14,3)<br>b 2,43 (1H, dd, 7,6, -14,8) |
|                  | 2''  | 116,9    5,03 (1H, t 8,1)  |
|                  | 3''  | 136,6  |
|                  | 4''  | 18,0    1,68 (3H, s)   |
|                  | 5''  | 25,8    1,62 (3H, s)   |
| Isopren II       | 1''' | 27,4    a 1,67 (1H, m)<br>b 2,02 (1H, m)                           |
|                  | 2''' | 121,5    4,99 (1H, t, 7,7)   |
|                  | 3''' | 134,2  |
|                  | 4''' | 17,9    1,56 (3H, s)   |
|                  | 5''' | 25,8    1,69 (3H, s)   |

Für Substanz **30** konnte im ESI-HRMS ein Pseudomolekülion mit  $m/z$  389,2687  $[M+H]^+$  (berechnet 389,2686) ermittelt und daraus die Summenformel  $C_{24}H_{36}O_4$  errechnet werden.

Bereits das  $^1H$ -NMR-Spektrum von **30** deutet anhand tieffeldverschobener Triplets ( $\delta_H$  4,99 und 5,03 ppm) zwei Isopreneinheiten und durch ein charakteristisches Triplett und Dublett ( $\delta_H$  0,74 und 1,03 ppm) im Hochfeld einen 2-Methylbutyrylrest an. Bestätigt wurden diese Bausteine durch HMBC-Kreuzsignale entsprechend den vorhergehenden Substanzen (**Kapitel 2.3.1**, S. 91).

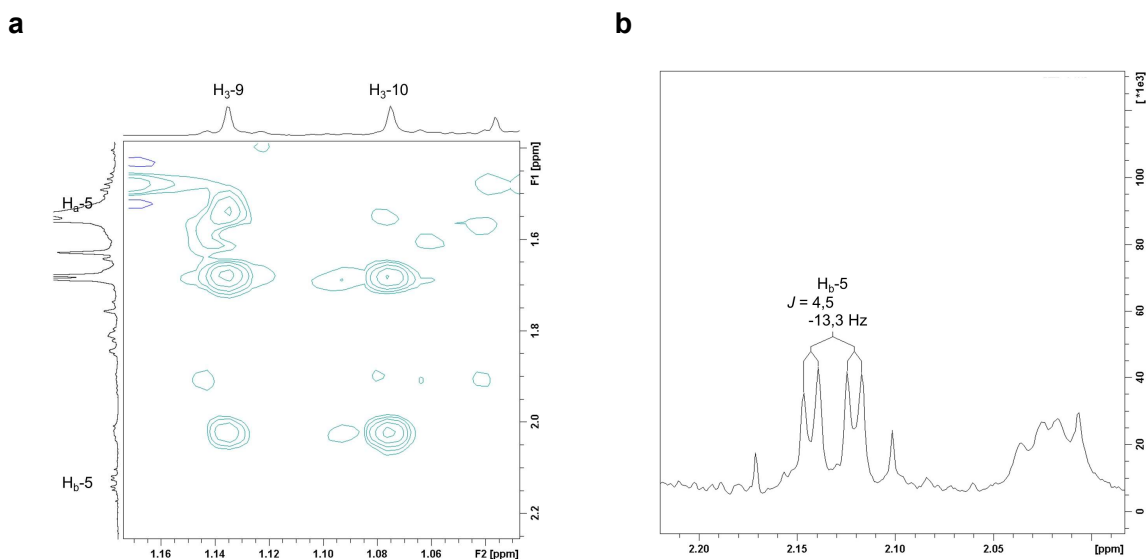
Das bizyklische Grundgerüst wurde ebenfalls anhand zahlreicher HMBC Korrelationen angezeigt. Die beiden geminalen Methylgruppen  $H_3$ -9 ( $\delta_H$  1,14 ppm) und  $H_3$ -10 ( $\delta_H$  1,07 ppm) zeigten Korrelationen zu C-1 ( $\delta_C$  97,3 ppm), C-6 ( $\delta_C$  41,8 ppm), C-7 ( $\delta_C$  49,4 ppm) und entweder C-9 ( $\delta_C$  16,1 ppm) oder C-10 ( $\delta_C$  22,5 ppm) (**Abbildung 127, a**). Ausgehend von der Methylengruppe  $H_2$ -5 ( $\delta_H$  1,52 ppm und 2,13 ppm) konnten Kreuzsignale zu C-3 ( $\delta_C$  172,0 ppm), C-4 ( $\delta_C$  57,0 ppm), C-6 ( $\delta_C$  41,8 ppm), C-7 ( $\delta_C$  49,4 ppm) und C-8 ( $\delta_C$  201,2 ppm) des Grundkörpers sowie zu C-1'' ( $\delta_C$  26,2 ppm) und C-1''' ( $\delta_C$  27,4 ppm), den Methylenkohlenstoffatomen der Isoprenreste, detektiert werden (**Abbildung 127, b**).



**Abbildung 127** Ausschnitte aus dem HMBC-Spektrum von **30** mit Kreuzsignalen der Methylgruppen  $H_3$ -9 und  $H_3$ -10 zu C-1, C-6, C-7 und C-9 oder C-10 (**a**) und der Methylengruppe  $H_2$ -5 zu C-3, C-4, C-6, C-7, C-8, C-1'' und C-1''' (**b**)

Die auffällige Verschiebung des Kohlenstoffatoms C-3 zusammen mit der Summenformel wiesen auf das Vorhandensein einer Lactonstruktur, genauer eines  $\gamma$ -Lactons, hin, wodurch sich oben gezeigte Struktur (**Abbildung 126**) für **30** ergab.

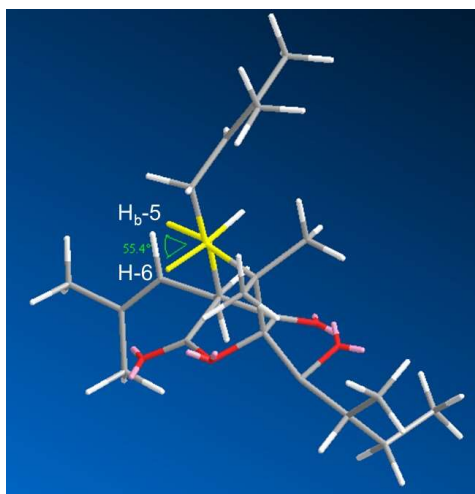
Wie bei den vorhergehenden bizyklischen Grundkörpern wurde die relative Konfiguration der Stereozentren C-1 und C-4 aufgrund der Starrheit des Systems festgelegt. Das Chiralitätszentrum C-6 wurde durch sorgfältige Auswertung der NOESY-Daten ermittelt. So war im Spektrum ein deutlicher NOE-Effekt zwischen H<sub>3</sub>-9 und H<sub>a</sub>-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1,52 ppm), aber nicht zwischen H<sub>3</sub>-9 und H<sub>b</sub>-5 zu erkennen (**Abbildung 128, a**). Da von beiden Methylgruppen keine Signale zu H<sub>b</sub>-5 identifiziert werden konnten, konnte sowohl die Position von H<sub>3</sub>-9 als auch die von H<sub>a</sub>-5 als axial beschrieben werden.



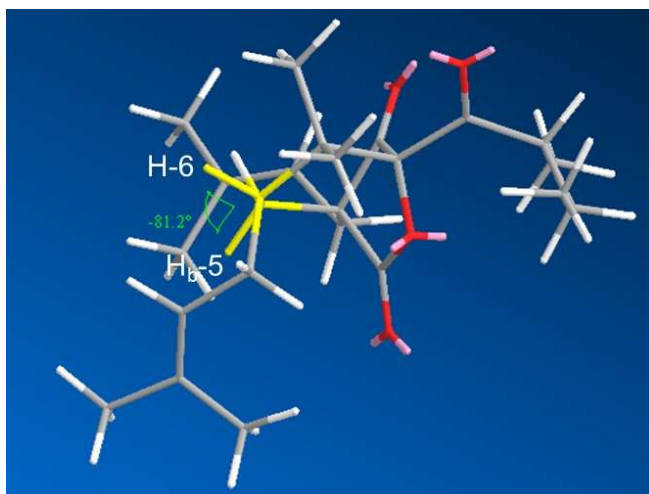
**Abbildung 128** Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von **30** mit Kreuzsignal zwischen H<sub>3</sub>-9 und H<sub>a</sub>-5 (**a**) und Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-Spektrum von **30** mit dem Aufspaltungsmuster und den Kopplungskonstanten des Protons H<sub>b</sub>-5 (**b**)

Um die relative Position von H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  1,68 ppm) zu ermitteln, wurde das Aufspaltungsmuster für H<sub>b</sub>-5, das in **Abbildung 128 (b)** zu sehen ist, betrachtet. Das Proton erschien im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von 4,5 und -13,3 Hz. Dabei entspricht die große Kopplungskonstante der beiden vicinalen H-Atome H<sub>a</sub>-5 und H<sub>b</sub>-5 und die kleinere der zwischen H<sub>b</sub>-5 und H-6. Das Ausmessen der Diederwinkel zwischen H<sub>b</sub>-5 und H-6 im dreidimensionalen Modell für **30**, ergab bei axialer Position des Protons H-6 rund 55° und bei äquatorialer Position etwa 80° (**Abbildung 129**), was entsprechend der Karplus-Kurve zu Kopplungskonstanten von etwa 4 Hz bzw. unter 2 Hz führt. Somit konnte für das Wasserstoffatom H-6 eine axiale Orientierung angenommen werden.

a



b



**Abbildung 129** Dreidimensionales Modell der Struktur von **30** mit axialer (a) bzw. äquatorialer-Orientierung (b) des Protons H-6 und gemessener Diederwinkel zwischen H<sub>b</sub>-5 und H-6; in grau ist das Kohlenstoffgrundgerüst dargestellt, weiß entspricht jeweils einem Proton, rot jeweils einem Sauerstoffatom und pink sind die freien Elektronenpaare

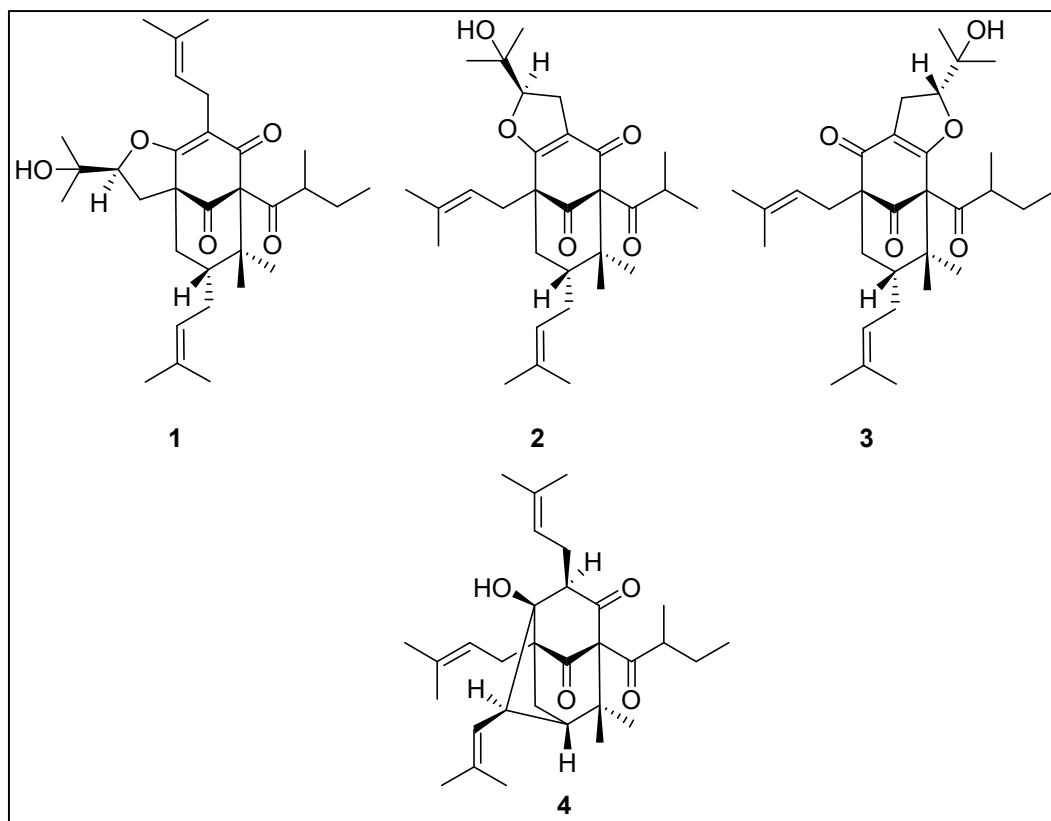
Insgesamt kann die relative Stereochemie der Chiralitätszentren als 1S\*, 4S\* und 6S\* beschrieben werden.

Die Literaturrecherche ergab, dass es sich bei **30** um das bereits bekannte **Soulattron A**, ein Terpenoid, das aus *Calophyllum soulattri* (Nigam et al. 1988) isoliert wurde, handelt. Eine vergleichbare Substanz, **Garciniellipton J**, wurde außerdem bereits für *Garcinia subelliptica* (Weng et al. 2003) beschrieben.



## 2.4 Zusammenfassung und Diskussion

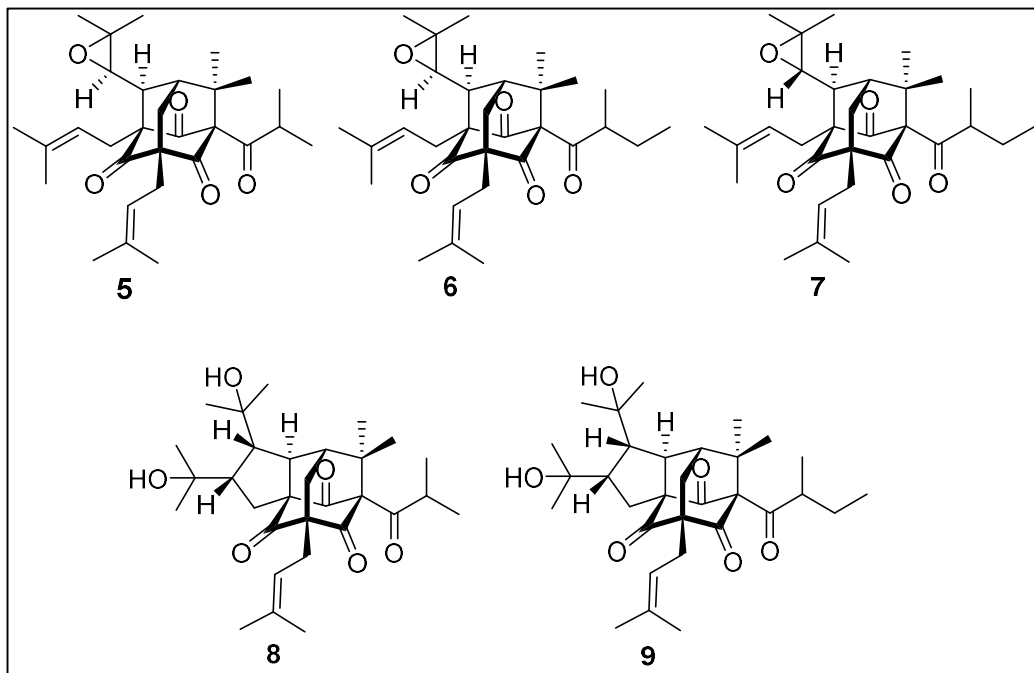
### 2.4.1 Überblick über die isolierten Verbindungen



**Abbildung 130** Übersicht zu den Strukturen der isolierten **Acylphloroglucinole vom A-Typ** (1 bis 4) aus dem PE-Extrakt von *Hypericum hirsutum*

**Tabelle 54** Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); UV-Maximum (Spezifischer Absorptionskoeffizient);  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten; Massedaten; Summenformel

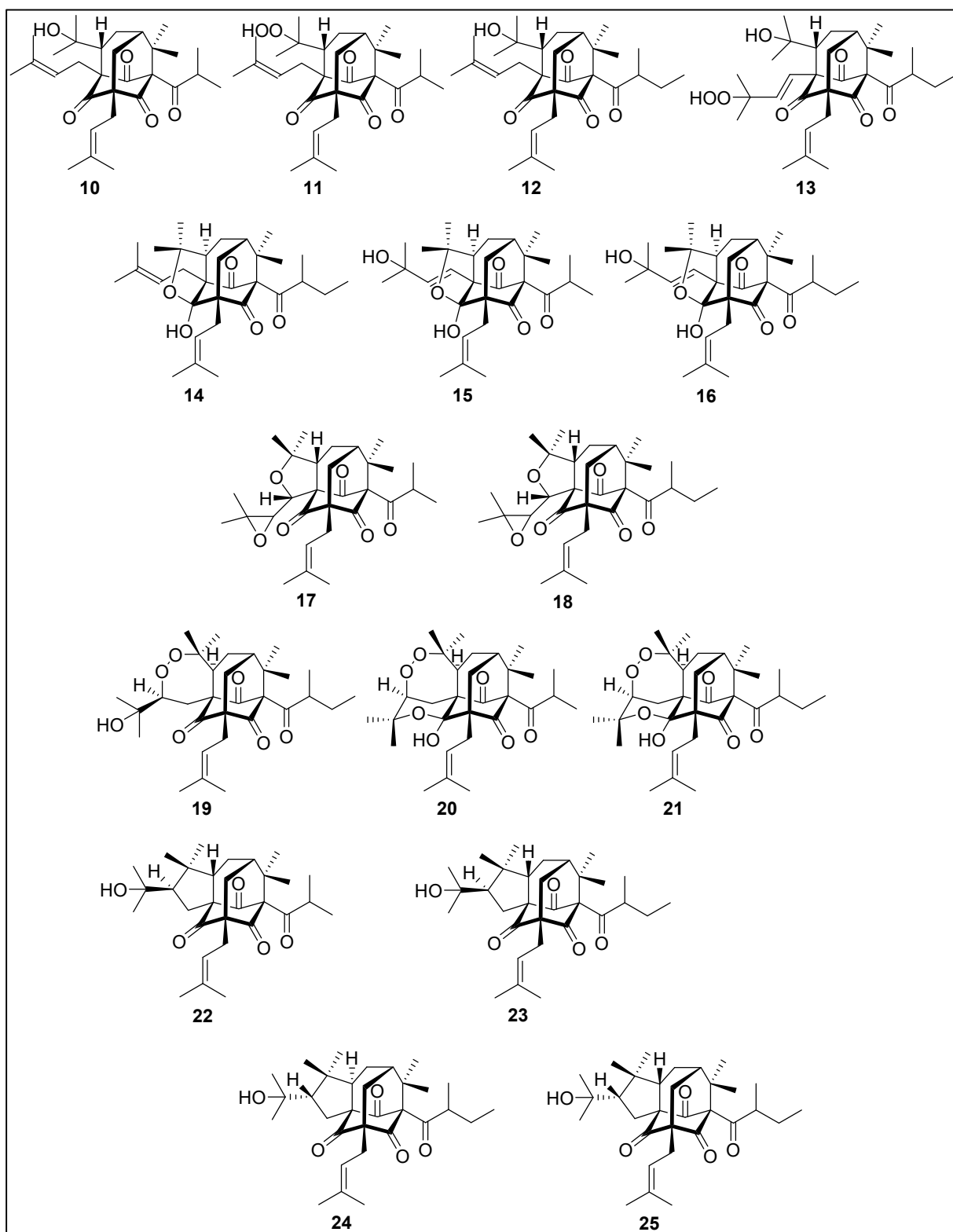
| Acylphloroglucinole vom A-Typ |   |
|-------------------------------|---|
| <b>1 Neu, Hirsutinan A</b>    | Farbloses Öl (4,0 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -25$ (c 0,5, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 275 (6,87) nm; $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 40</b> , S. 102; ESI-HRMS $m/z$ 499,3425 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 499,3418); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$ |
| <b>2 Neu, Hirsutinan B</b>    | Farbloses Öl (1,7 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -2$ (c 0,2, MeOH) UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 285 (3,59) nm; $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 40</b> , S. 102; ESI-HRMS $m/z$ 507,3082 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 507,3081); $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$  |
| <b>3 Neu, Hirsutinan C</b>    | Farbloses Öl (2,1 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -9$ (c 0,3, MeOH) UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 280 (3,67) nm; $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 40</b> , S. 102; ESI-HRMS $m/z$ 521,3239 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 521,3237); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$  |
| <b>4 Neu, Hyperihirsutol</b>  | Farbloses Öl (1,4 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -10$ (c 0,2, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 41</b> , S. 112; ESI-HRMS $m/z$ 505,3284 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 505,3288); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$   |



**Abbildung 131** Übersicht zu den Strukturen der isolierten **Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ (5 bis 9)** aus dem PE-Extrakt von *Hypericum hirsutum*

**Tabelle 55** Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel);  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten; Massedaten; Summenformel

| Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>5</b>                              | <b>Bekannt, Hookerion C</b>   |
|                                       | Farbloses Öl (4,5 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} +7$ (c 0,6, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 42</b> , S. 121; ESI-HRMS $m/z$ 483,3110 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 483,3105); $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_5$   |
| <b>6</b>                              | <b>Neu, Hirsuton A</b>  |
|                                       | Farbloses Öl (6,6 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} +4$ (c 0,8, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 42</b> , S. 121; ESI-HRMS $m/z$ 497,3263 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 497,3262); $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_5$   |
| <b>7</b>                              | <b>Neu, Hirsuton B</b>  |
|                                       | Farbloses Öl (2,4 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} +7$ (c 0,3, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 42</b> , S. 121; ESI-HRMS $m/z$ 497,3263 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 497,3262); $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_5$   |
| <b>8</b>                              | <b>Neu, Hyperihirsolin A</b>  |
|                                       | Farbloses Öl (5,0 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -25$ (c 0,6, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 43</b> , S. 126; ESI-HRMS $m/z$ 523,3036 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 523,3036); $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6$ |
| <b>9</b>                              | <b>Neu, Hyperihirsolin B</b>  |
|                                       | Farbloses Öl (7,2 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -13$ (c 0,9, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 43</b> , S. 126; ESI-HRMS $m/z$ 537,3188 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 537,8187); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_6$ |



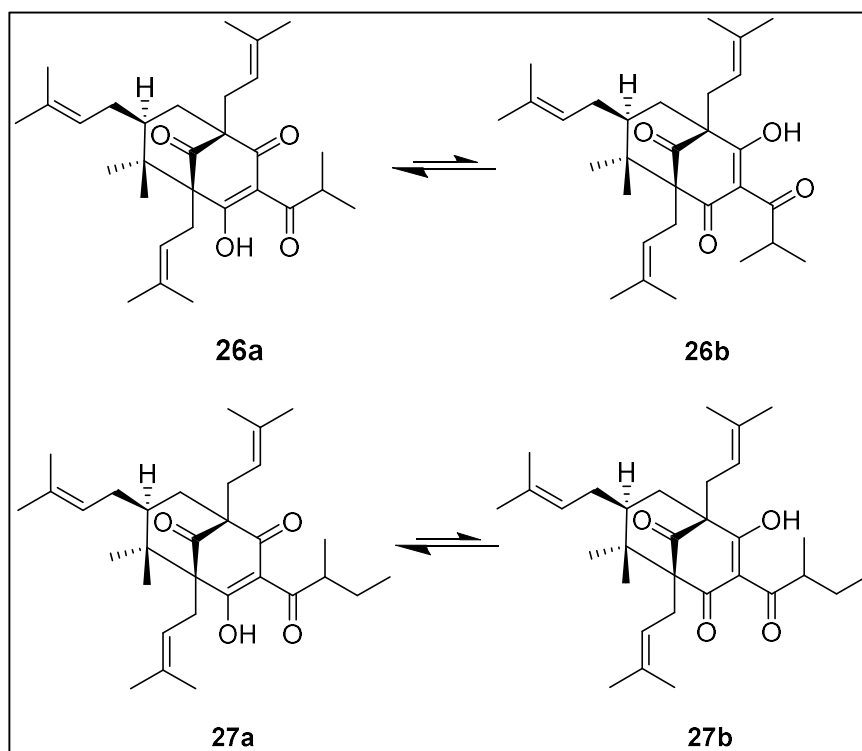
**Abbildung 132** Übersicht zu den Strukturen der isolierten **Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ (10 bis 25)** aus dem PE-Extrakt von *Hypericum hirsutum*

**Tabelle 56** Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten; Massedaten; Summenformel

| <b>Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ</b> |  |
|--|--|
| <b>10 Neu, Hirsutofolin A</b>                    | Farbloses Öl (5,2 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> +6 (c 0,7, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 44</b> , S. 135; ESI-HRMS <i>m/z</i> 485,3266 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 485,3262); C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>   |
| <b>11 Neu, Peroxyhirsutofolin A</b>              | Farbloses Öl (6,3 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> +12 (c 0,8, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 44</b> , S. 135; ESI-HRMS <i>m/z</i> 501,3220 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 501,3211); C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>  |
| <b>12 Neu, Hirsutofolin B</b>                    | Farbloses Öl (34,6 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> -12 (c 1,2, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 45</b> , S. 139; ESI-HRMS <i>m/z</i> 499,3424 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 499,3418); C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub> |
| <b>13 Neu, 3'''-Hydroperoxyisohirsutofolin B</b> | Farbloses Öl (4,1 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> +20 (c 0,5, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 45</b> , S. 139; ESI-HRMS <i>m/z</i> 553,3139 [M+Na] <sup>+</sup> (berechnet 553,3136); C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub> |
| <b>14 Neu, Hirsutuman B</b>                      | Farbloses Öl (26,4 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> -62 (c 0,7, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 46</b> , S. 142; ESI-HRMS <i>m/z</i> 499,3426 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 499,3418); C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub> |
| <b>15 Neu, 3'''-Hydroxyisohirsutuman A</b>       | Farbloses Öl (1,0 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> -35 (c 0,1, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 46</b> , S. 142; ESI-HRMS <i>m/z</i> 501,3214 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 501,3211); C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>  |
| <b>16 Neu, 3'''-Hydroxyisohirsutuman B</b>       | Farbloses Öl (6,0 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> -54 (c 0,6, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 46</b> , S. 142; ESI-HRMS <i>m/z</i> 515,3364 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 515,3367); C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>  |
| <b>17 Neu, Hirsutelan A</b>                      | Farbloses Öl (1,1 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> +56 (c 0,1, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 47</b> , S. 148; ESI-HRMS <i>m/z</i> 499,3053 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 499,3054); C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub>  |
| <b>18 Neu, Hirsutelan B</b>                      | Farbloses Öl (3,2 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>24</sup> +35 (c 0,2, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 47</b> , S. 148; ESI-HRMS <i>m/z</i> 513,3209 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 513,3211); C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>  |
| <b>19 Neu, Hyperihirsan B</b>                    | Farbloses Öl (1,4 mg); [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>26</sup> +48 (c 0,2, MeOH); <sup>1</sup> H- und <sup>13</sup> C-NMR-Daten in <b>Tabelle 48</b> , S. 153; ESI-HRMS <i>m/z</i> 531,3310 [M+H] <sup>+</sup> (berechnet 531,3316); C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub>  |

Fortsetzung Tabelle 56

|           |  |
|-----------|--|
| <b>20</b> | <b>Neu, Pyranohyperihirsan A</b>   |
|           | Farbloses Öl (2,3 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -25 (c 0,3, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 48</b> , S. 153; ESI-HRMS $m/z$ 517,3169 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 517,3160); $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_7$ |
| <b>21</b> | <b>Neu, Pyranohyperihirsan B</b>   |
|           | Farbloses Öl (2,0 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -30 (c 0,3, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 48</b> , S. 153; ESI-HRMS $m/z$ 531,3319 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 531,3316); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_7$ |
| <b>22</b> | <b>Neu, Hirsutusal A</b>   |
|           | Farbloses Öl (1,4 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ +37 (c 0,2, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 49</b> , S. 158; ESI-HRMS $m/z$ 485,3260 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 485,3262); $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$ |
| <b>23</b> | <b>Neu, Hirsutusal B</b>   |
|           | Farbloses Öl (2,0 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -7 (c 0,3, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 49</b> , S. 158; ESI-HRMS $m/z$ 499,3416 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 499,3418); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$  |
| <b>24</b> | <b>Neu, Hirsutusal C &amp; D</b>   |
| <b>25</b> | Farbloses Öl (2,8 mg); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 50</b> , S. 162; ESI-HRMS $m/z$ 499,3420 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 499,3418); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$   |

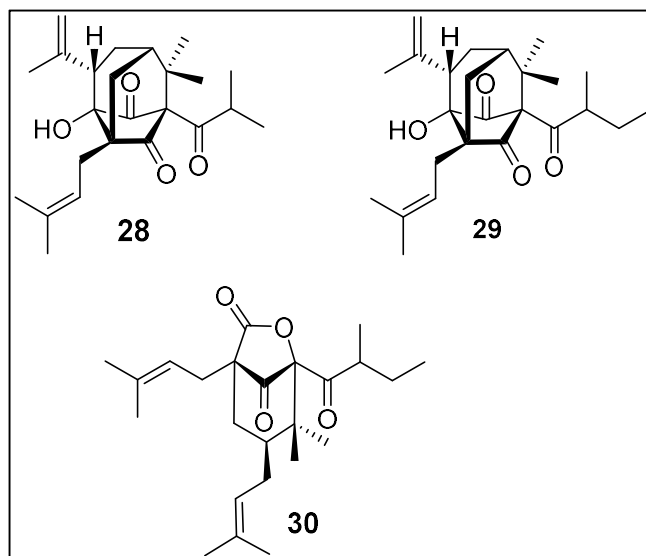


**Abbildung 133** Übersicht zu den Strukturen der isolierten **Acylphloroglucinole vom B I-Typ (26 und 27)** aus dem PE-Extrakt von *Hypericum hirsutum*

**Tabelle 57** Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel); UV-Maximum (Spezifischer Absorptionskoeffizient);  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten; Massedaten; Summenformel

| Acylphloroglucinole vom B I-Typ  |                            |
|--|----------------------------|
| <b>26a/b</b>   | <b>Neu, Hyperihirsum A</b> |
| Gelbes Öl (4,6 mg); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 240 (3,91) 280 (3,99) nm; $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 51</b> , S. 168; 485,3261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 485,3262); $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$ |                            |
| <b>27a/b</b>   | <b>Neu, Hyperihirsum B</b> |
| Gelbes Öl (5,8 mg); UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}}(\log \epsilon)$ 235 (3,92) 275 (4,02) nm; 499,3422 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 499,3418); $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_4$  |                            |





**Abbildung 134** Übersicht zu den weiteren Strukturen (28 bis 30) aus dem PE-Extrakt von *Hypericum hirsutum*

**Tabelle 58** Aggregatzustand (isolierte Menge); spezifische Drehung (Konzentration, Lösungsmittel);  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten; Massedaten; Summenformel

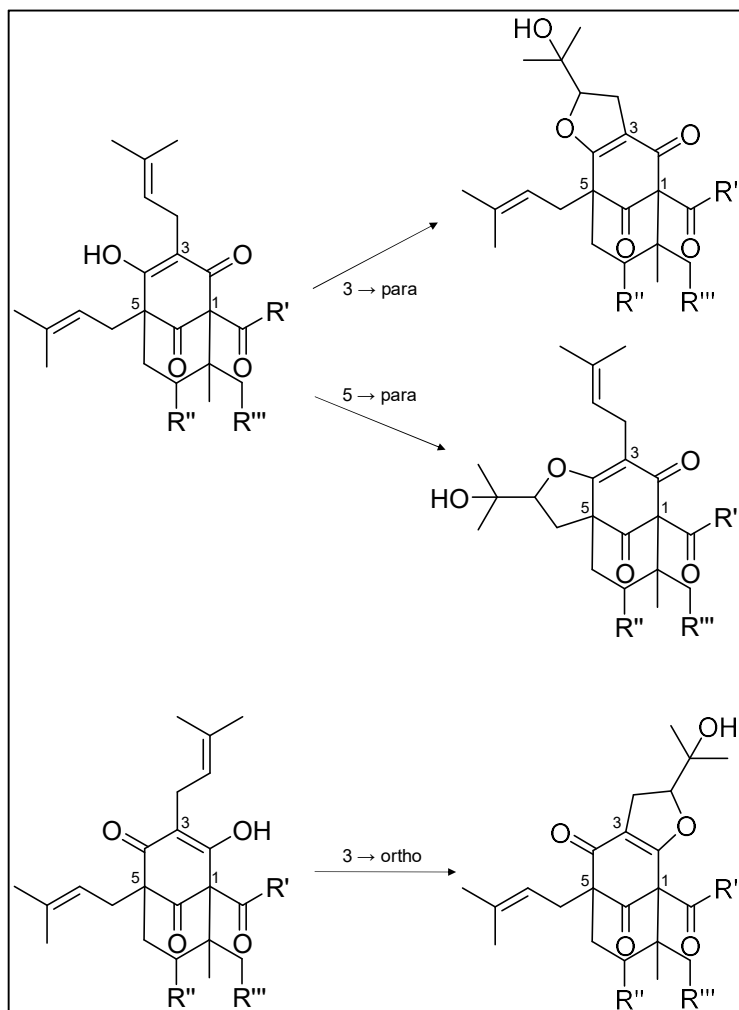
| weitere Substanzen   |                                |
|--|--------------------------------|
| <b>28</b>  | <b>Neu, Hyperihirsuzerol A</b> |
| Farbloses Öl (1,0 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -12$ (c 0,1, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 52</b> , S. 175; 409,2348 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet 409,2349); $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$ |                                |
| <b>29</b>  | <b>Neu, Hyperihirsuzerol B</b> |
| Farbloses Öl (1,9 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -31$ (c 0,2, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 52</b> , S. 175; 401,2689 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 401,2686); $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$  |                                |
| <b>30</b>  | <b>Bekannt, Soulattron A</b>   |
| Farbloses Öl (1,2 mg); $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -28$ (c 0,2, MeOH); $^1\text{H}$ - und $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten in <b>Tabelle 53</b> , S. 179; 389,2687 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet 389,2686); $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{O}_4$  |                                |

## 2.4.2 Chemotaxonomische Einordnung der isolierten Verbindungen

Das Acylphloroglucinol-Spektrum der *Hypericum*-Arten, die in Sektion 18 vereint werden, ist bislang weitestgehend unerforscht. Für einige Vertreter konnten die beiden prominenten Acylphloroglucinole vom A-Typ **Hyperforin** und **Adhyperforin** nachgewiesen werden (Smelcerovic und Spiteller 2006; Camas et al. 2014). Aus *H. linarioides* gelang zudem die Isolierung zweier monozyklischer, geranylierter Derivate, **3-Geranyl-1-(2'-methylpropanoyl)phloroglucinol** und **3-Geranyl-1-(2'-methylbutanoyl)phloroglucinol** (Crockett et al. 2010).

### 2.4.2.1 Acylphloroglucinole vom A-Typ

Bei den hier isolierten Acylphloroglucinolen vom A-Typ handelt es sich um polyzyklische Derivate, die neben der essentiellen C-5-C-1-Verknüpfung die Bildung einer Furano-Einheit (**1** bis **3**) oder einen zusätzlichen C-C-Ringschluss (**4**) aufweisen. Die C-O-Verknüpfung kann dabei wie bereits erwähnt (**Kapitel 1.3.2**, S. 15) entweder in *ortho*- oder in *para*-Stellung zur Acylgruppe erfolgen. Bei den bityklischen Acylphloroglucinolen kann außerdem unterschieden werden, ob in den Ringschluss die Prenyleinheit an C-3 oder C-5 involviert ist. In **Abbildung 135** sind alle Optionen graphisch dargestellt.



**Abbildung 135** Optionen zur Bildung der Furano-Einheit bei bityclischen Acylphloroglucinolen vom A-Typ

Intensive Literaturrecherchen ergaben, dass Furano-Derivate bislang hauptsächlich aus *Hypericum*-Arten der Sektionen 3 *Ascyreia*, 9 *Hypericum* und 9c *Sampsonia* isoliert wurden. Aber auch in *H. elodeoides* und *H. petiolulatum* (Sektion 9d *Elodeoida*) und *H. scabrum* (Sektion 17 *Hirtella*) konnten Vertreter gefunden werden.

Der 5-*para*-Ringschluss, wie er in **1** zu finden ist, ist für einige Acylphloroglucinole, die aus *H. cohaerens* (Sektion 3) isoliert wurden, beschrieben (Liu et al. 2013a). Beim bekanntesten Abkömmling dieser Klasse handelt es sich wohl um das **Furohyperforin** (Trifunović et al. 1998). Auch für zwei weitere Vertreter der Sektion 3, *H. henryi* (Guo et al. 2008; Yang et al. 2015; Liao et al. 2016) und *H. uralum* (Zhou et al. 2016a), ist diese Art der Zyklisierung bekannt. Aus den Arten *H. perforatum* (Lee et al. 2006; Guo et al. 2017), *H. erectum* (Ishida et al. 2010) und *H.*

*attenuatum* (Zhou et al. 2014; Li et al. 2015a; Zhou et al. 2016b) der Sektion 9 konnten ebenfalls Verbindungen mit dieser trizyklischen Grundstruktur ermittelt werden. Die meisten Derivate dieser Klasse konnten allerdings aus *H. sampsonii*, einer Art der Sektion 9c, isoliert werden (Tian et al. 2014b; Zhu et al. 2015b). Das **Hypercohin G** konnte neben *H. cohaerens* auch aus *H. elodeoides* (Sektion 9d) isoliert werden (Hashida et al. 2014). Die Bearbeitung des Ethanol-Extrakts der oberirdischen Teile von *H. scabrum*, einem Vertreter der Hirtella-Gruppe (Sektion 17) führte ebenfalls zur Isolierung einiger 5-*para*-Furano-Derivate (Liu et al. 2014; Gao et al. 2016a; Gao et al. 2016c).

Substanz **2** weist eine 3-*para*-Furano-Einheit auf und leitet sich somit vom **Furohyperforin Isomer 1** ab (Lee et al. 2006; Liu et al. 2013a; Zhou et al. 2014). Strukturell ähnliche Substanzen wurden abermals aus Arten der Sektion *Ascyreia* isoliert, dieses Mal allerdings neben *H. cohaerens* (Liu et al. 2013a), *H. henryi* (Chen et al. 2010) und *H. uralum* (Zhou et al. 2016a), vor allem aus *H. monogynum* (Xu et al. 2015). Auch aus der Sektion *Hypericum* waren es wieder die bereits bekannten Arten *H. erectum* (Ishida et al. 2010), *H. attenuatum* (Zhou et al. 2014; Li et al. 2015a) und *H. perforatum* (Lee et al. 2006; Hashida et al. 2008a; Guo et al. 2017) in denen verwandte Verbindungen gefunden wurden. Auch sind Strukturen mit dieser Verknüpfung für *H. sampsonii* (Sektion *Sampsonia*) bekannt, jedoch weniger prominent (Xiao et al. 2007; Tian et al. 2016; Zhang et al. 2016). Die Isolierung von **Dihroxuralodin** gelang aus *H. petiolulatum*, einer bislang nicht erwähnten Art aus Sektion 9d (Rui et al. 2017). Und auch aus *H. scabrum*, dem bereits erwähnten Vertreter der Hirtella-Gruppe, sind Substanzen mit diesem Grundgerüst bekannt (Liu et al. 2017).

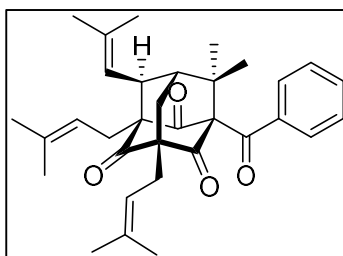
**Furohyperforin Isomer 2** ist ein Vertreter der Acylphloroglucinole vom A-Typ mit zusätzlicher 3-*ortho*-Furano-Einheit (Lee et al. 2006). Von den in dieser Arbeit isolierten Verbindungen leitet sich **3** von dieser Struktur ab. Diese Grundstruktur wurde bereits für zahlreiche Substanzen beschrieben, die in den bereits erwähnten Arten gefunden wurden (Xiao et al. 2007; Wang et al. 2012; Zeng et al. 2012; Zhou et al. 2014; Xu et al. 2015; Gao et al. 2016b; Yang et al. 2016; Guo et al. 2017; Liu et al. 2017; Yang et al. 2017b).

Interessant erscheint, dass die in dieser Arbeit ermittelte *R*\*-Konfiguration an C-7 bislang nur für Verbindungen aus Arten der Sektionen 9 und 9c beschrieben wurde. Die meisten, die aus *H. attenuatum* und *H. erectum* sowie alle aus *H. sampsonii* isolierten trizyklischen Acylphloroglucinole mit Furano-Einheit, ungeachtet der Verknüpfung, weisen die  $\alpha$ -Orientierung des Prenylrestes an C-7 auf.

Es konnte trotz gründlicher Literaturrecherche keine Verbindung mit einer vergleichbaren trizyklischen Struktur wie der von **4** gefunden werden. Diese ist somit bislang einzigartig und kann für die chemotaxonomische Einordnung nicht verwendet werden.

#### 2.4.2.2 Acylphloroglucinole vom Adamantan-Typ

Acylphloroglucinol-Derivate mit einem komplexen trizyklischen Adamantan-Grundkörper sind in der Literatur bereits bekannt und werden für zahlreiche *Hypericum*-Arten beschrieben. Es fällt auf, dass die meisten Arten wieder den Sektionen 3, 9 und 9c zuzuordnen sind. Die hier isolierten Verbindungen gehen auf folgende Substanz (**Abbildung 136**) zurück, die aus *H. henryi* isoliert wurde (Yang et al. 2015):



**Abbildung 136** Struktur von **Plukenetion A**, das erste beschriebene Adamantan-Derivat (Henry et al. 1996)

Durch Oxidation der Isopreneinheiten und unterschiedliche Zyklisierungsreaktionen entstehen die etwa 35 bekannten Vertreter dieser Kategorie (Yang et al. 2018). Während es sich bei den Arten der Sektionen 9 und 9c um die bereits bei den Acylphloroglucinolen vom A-Typ genannten, *H. attenuatum* (Li et al. 2015b), *H. erectum* (Ishida et al. 2010) und *H. sampsonii* (Xiao et al. 2007; Zhu et al. 2014) handelt, tritt in Sektion 3 eine bislang unbekannte Art in den Vordergrund. So wurde eine Vielzahl der Derivate in *H. hookerianum* gefunden (Ye et al. 2016). Auch aus *H. subsessile* (Liao et al. 2015), *H. henryi* (Yang et al. 2015) und *H. pseudohenryi* (Yang et al. 2017a) konnten Verbindungen mit dieser käfigartigen Struktur isoliert werden. Zusätzlich wurden aus *H. androsaemum* (Sektion 5 *Androsaemum*) **Hyperandron A** (Wang et al. 2012) und für *H. sinaicum* (Sektion 27 *Adenosepalum*) **Sinaicinon** (Rezanka und Sigler 2007) beschrieben.

Anzumerken ist außerdem, dass alle der aus Sektion 9 bzw. 9c isolierten Verbindungen einen aromatischen Acylrest aufweisen, wohingegen die Derivate aus Sektion 3 sowohl aliphatisch als auch arylisch acyliert sind.

### 2.4.2.3 Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ

Aus der Klasse der Acylphloroglucinole mit Homoadamantan-Grundstruktur sind knapp 50 Verbindungen bekannt, von denen über die Hälfte aus *H. sampsonii* (Sektion 9c) isoliert wurden (Xiao et al. 2007; Zeng et al. 2009; Xiao et al. 2010; Zeng et al. 2012; Chen et al. 2014; Tian et al. 2014c; Tian et al. 2014a; Tian et al. 2014b; Zhang et al. 2016; Zhu et al. 2016b). Auch in *H. henryi* (Yang et al. 2015) und *H. pseudohenryi* (Yang et al. 2017a) (Sektion 3), sowie *H. attenuatum* (Zhou et al. 2014; Li et al. 2015b; Li et al. 2015a) und *H. erectum* (Ishida et al. 2010) (Sektion 9) konnten parallel zu den Acylphloroglucinolen vom A-Typ mit Furano-Einheit und PPAPs vom Adamantan-Typ auch Derivate vom Homoadamantan gefunden werden. Für *H. cohaerens* konnten bislang lediglich drei Substanzen mit dem Tricyclo[4.3.1.1<sup>3,7</sup>]undecan-Grundkörper beschrieben werden (Liu et al. 2013b), Derivate mit einem Adamantan-Gerüst blieben jedoch bislang unentdeckt. Im Gegensatz dazu sind in der Literatur für *H. hookerianum* nur Acylphloroglucinole mit einem Tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan-Skelett aufgeklärt worden.

Die Acylreste nahezu aller bekannten Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ sind aromatischer Natur. Ausnahmen stellen lediglich das **Pseudohenon F** und **G**, die aus *H. pseudohenryi* isoliert wurden (Yang et al. 2017a) und das für *H. sampsonii* beschriebene Derivat **Hyper-sampson S** dar (Chen et al. 2014).

### 2.4.2.4 Acylphloroglucinole vom B I-Typ

Die Gruppe der Acylphloroglucinole vom B I-Typ vereint etwa 130 Substanzen, von denen lediglich knapp zehn Vertreter für *Hypericum* Arten beschrieben wurden. Weit häufiger ist diese Art der Zyklisierung in *Clusia*-, *Garcinia*-, *Moronobea*- und *Symphonia*-Arten (alle aus der Familie der Clusiaceae) zu finden (Yang et al. 2018).

Nur das **18-Hydroxy-7-epi-clusianon** und das **18-Acetoxyclusianon**, welche aus *H. hypericoi-des* (Sektion 20 *Myriandra*) isoliert wurden, weisen neben dem bizyklischen Grundkörper keinen zusätzlichen Ringschluss auf (Christian et al. 2008). Bei der Biosynthese aller anderen Vertreter kommt es zur Zyklisierung eines Isoprenrests zu einer Furano-Einheit. Gefunden wurde diese B I-Typ PPAPs bislang in *H. attenuatum* (Li et al. 2015a), *H. sampsonii* (Xiao et al. 2007; Tian et al. 2016) und *H. scabrum* (Gao et al. 2016b; Gao et al. 2016c; Gao et al. 2016a).

## ISOLIERUNG

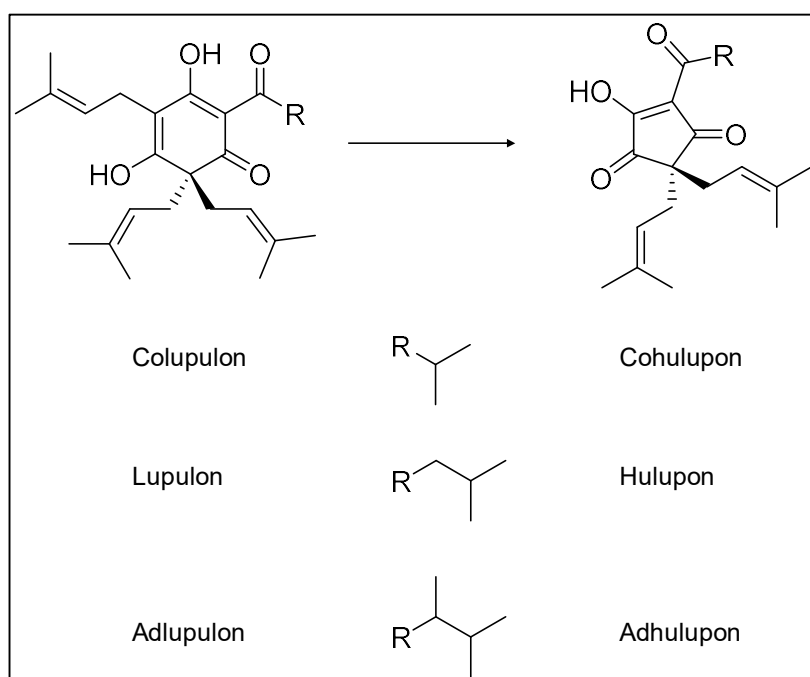
In **Tabelle 59** sind die Isolierungen der unterschiedlichen Acylphloroglucinol-Typen aus den verschiedenen Sektionen der Gattung *Hypericum* nochmals zusammengefasst. Der Übersichtlichkeit halber werden die Verknüpfungsmöglichkeiten der Furano-Einheit an das BPAP vom A-Typ nicht einzeln aufgeführt, sondern gemeinsam abgehandelt.

**Tabelle 59** Übersicht über das Vorkommen der unterschiedlichen Acylphloroglucinol-Typen in den Sektionen der Gattung *Hypericum*; alkyl = aliphatischer Acylrest, aryl = aromatischer Acylrest; X = Vorkommen

|                        | A-Typ |      | Adamantan |      | Homoadamantan |      | B I-Typ |      |
|------------------------|-------|------|-----------|------|---------------|------|---------|------|
|                        | alkyl | aryl | alkyl     | aryl | alkyl         | aryl | alkyl   | aryl |
| <b>Sektion 3</b>       |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. cohaerens</i>    | X     | X    |           |      |               | X    |         |      |
| <i>H. henryi</i>       | X     | X    |           | X    |               | X    |         |      |
| <i>H. hookerianum</i>  |       |      | X         | X    |               |      |         |      |
| <i>H. monogynum</i>    | X     |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. pseudohenryi</i> |       |      |           | X    | X             | X    |         |      |
| <i>H. subsessile</i>   |       |      | X         | X    |               |      |         |      |
| <i>H. uralum</i>       |       | X    |           |      |               |      |         |      |
| <b>Sektion 5</b>       |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. androsaemum</i>  |       |      |           | X    |               |      |         |      |
| <b>Sektion 9</b>       |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. attenuatum</i>   | X     | X    |           | X    |               | X    |         | X    |
| <i>H. erectum</i>      |       | X    |           | X    |               | X    |         |      |
| <i>H. perforatum</i>   | X     |      |           |      |               |      |         |      |
| <b>Sektion 9c</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. sampsonii</i>    |       | X    |           | X    | X             | X    |         | X    |
| <b>Sektion 9d</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. elodeoides</i>   | X     |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. petiolatum</i>   |       | X    |           |      |               |      |         |      |
| <b>Sektion 17</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. scabrum</i>      | X     | X    |           |      |               |      |         | X    |
| <b>Sektion 18</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. hirsutum</i>     | X     |      | X         |      | X             |      | X       |      |
| <b>Sektion 20</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. hypericoides</i> |       |      |           |      |               |      |         | X    |
| <b>Sektion 27</b>      |       |      |           |      |               |      |         |      |
| <i>H. sinaicum</i>     |       |      |           | X    |               |      |         |      |

### 2.4.2.5 Weitere Substanzen

Die Substanzen **28** und **29** scheinen mit ihrem fünfgliedrigen Grundring auf den ersten Blick nicht mit der Klasse der Acylphloroglucinole in Verbindung zu stehen. Allerdings erinnern die Verbindungen stark an die  $\beta$ -Bittersäuren des Hopfens (**Lupulone**), bei denen es durch Oxidation auch zur Ringverengung und damit zur Bildung der sogenannten **Hulupone** (Dušek et al. 2014) kommt (**Abbildung 137**).

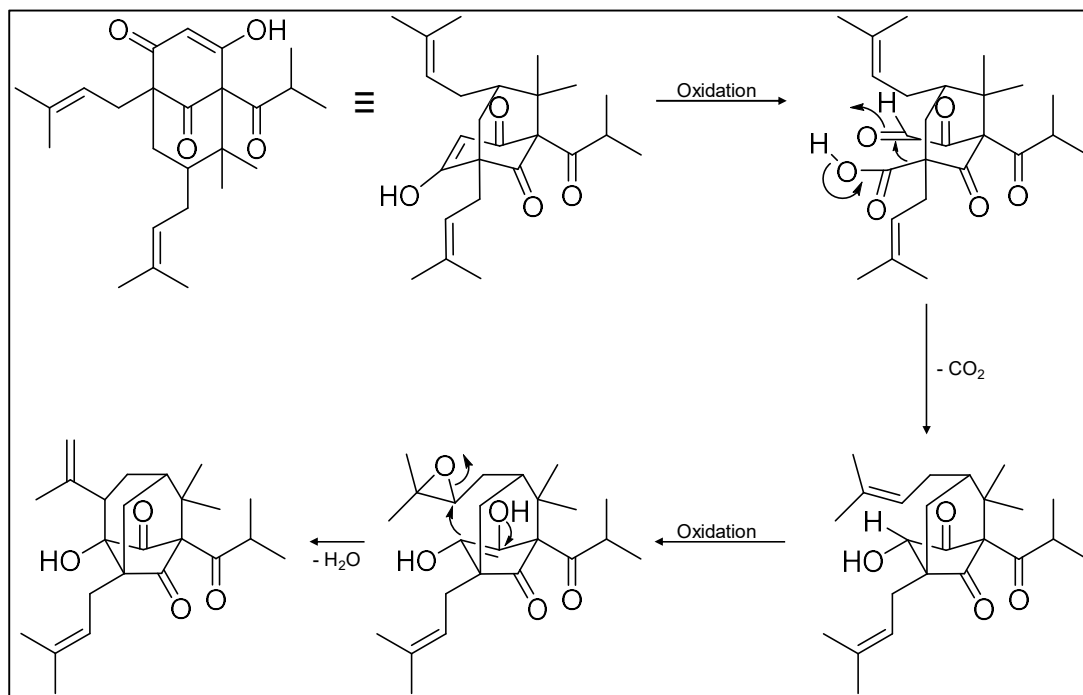


**Abbildung 137**  $\beta$ -Bittersäuren aus *Humulus lupulus* L. (**Lupulone**) und ihre Oxidationsprodukte, die **Hulupone**

In der Literatur findet sich mit **Lathrophytoische Säure A** eine Verbindung, die wie die in der vorliegenden Arbeit isolierten Substanzen einen trizyklischen Grundkörper besitzt (de Almeida et al. 2011). Im Review von Yang et al. (2018) wird diese Substanz als 4-*nor*-Homoadamantan-PPAP bezeichnet und ist bislang einmalig. Somit wird hier zum ersten Mal von 4-*nor*-Derivaten in der Familie der Hypericaceae berichtet.

In **Abbildung 138** ist der mögliche Biosyntheseweg für die beiden Substanzen dargestellt. Es wird ersichtlich, dass diese sich wie die hier beschriebenen Adamantan- und Homoadamantan-Derivate von BPAPs vom A-Typ ableiten.

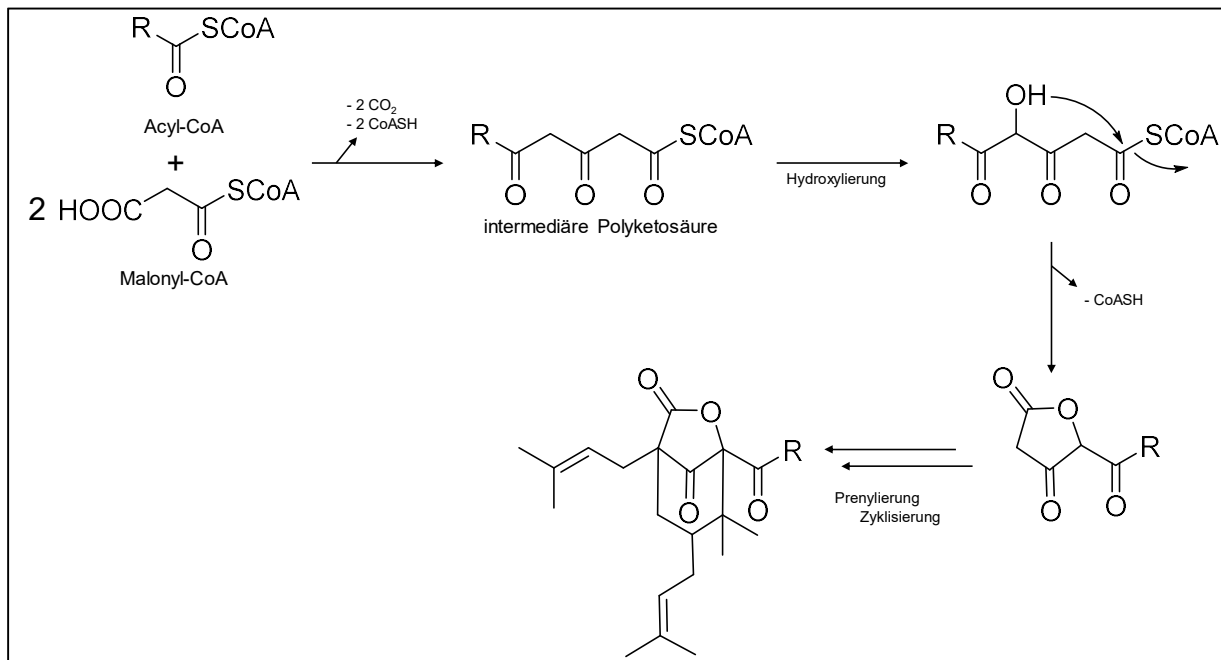




**Abbildung 138** Biosynthese der 4-*nor*-Derivate **28** und **29** am Beispiel von **28** ausgehend von einem Acylphloroglucinol vom A-Typ, abgeleitet vom vorgeschlagenen Biosyntheseweg für die **Lathrophytoische Säure A** (de Almeida et al. 2011)

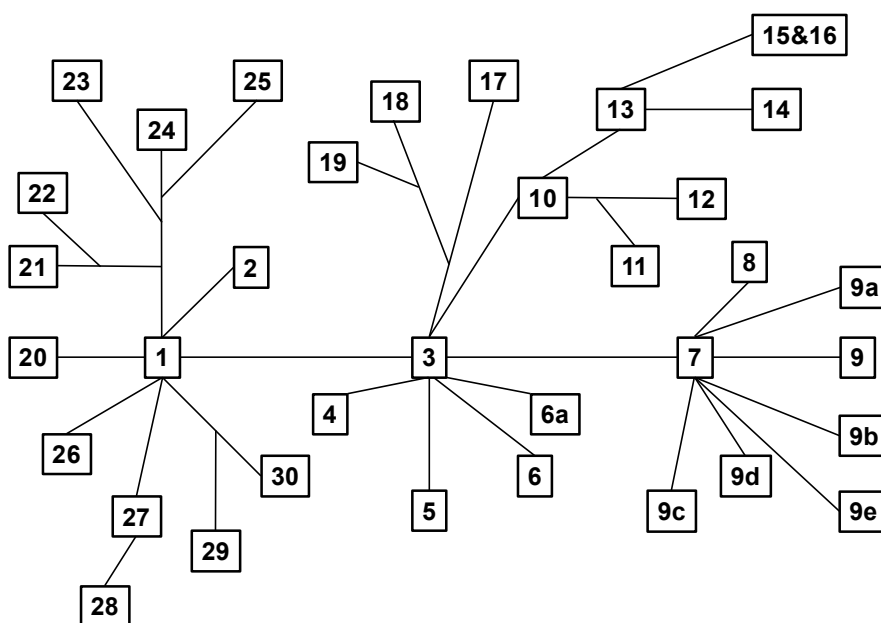
Bei **30** handelt es sich wie bereits erwähnt, um das aus *Calophyllum soulattri* (Calophyllaceae) isolierte **Soulattron A**. Die Bezeichnung als Terpenoid, wie sie von Nigam et al. (1988) gewählt wurde, scheint allerdings nicht korrekt, da es sich bei diesen, gleich den Terpenen, um Naturstoffe handelt, die sich vom Isopren ableiten. Während es sich bei Terpenen um reine Kohlenwasserstoffe handelt, sind bei den Terpenoiden funktionelle Gruppen enthalten.

Die hier gezeigte Substanz wird jedoch vermutlich, vergleichbar mit den Acylphloroglucinolen, über eine gemischte Biosynthese gebildet. Der  $\gamma$ -Lactonring mit der Acyleinheit entsteht über den Polyketidweg. Anders als bei den Acylphloroglucinolen reagiert vermutlich eine Startersäure, in diesem Fall 2-Methylbutyryl-CoA, mit lediglich 2 Einheiten Malonyl-CoA. Die daraus resultierende Polyketosäure wird anschließend hydroxyliert, was zu einer spontanen Lacton-Bildung führt (**Abbildung 139**). Dieser Grundkörper wird dann mit Isopreneinheiten, die über den Acetat-Mevanolat-Weg (**Abbildung 7**, S. 16) gebildet werden, substituiert. Durch eine Zyklisierungsreaktion vergleichbar der, der BPAPs vom A-Typ, entsteht der bizyklische Grundkörper.

**Abbildung 139** postulierter Biosyntheseweg für **30**

### 2.4.2.6 Einordnung in das bestehende System

In **Abbildung 140** ist der Stammbaum der 36 Sektionen der Gattung *Hypericum* basierend auf den Arbeiten von N.K.B. Robson graphisch dargestellt. Die Basis bilden die Sektionen 1 *Campylosporus*, 3 *Ascyreia* und 7 *Roscyna*. Während sich aus Sektion 1 die Sektionen 2 sowie 20 bis 30 entwickeln, entspringen Sektionen 4 bis 6a und 10 bis 19 der 3. Sektion. Die verbleibenden Sektionen 8 und 9 bis 9e haben Sektion 7 als gemeinsame Vorfahrengruppe.



**Abbildung 140** Verwandtschaft zwischen den Sektionen der Gattung *Hypericum* L. entsprechend Crockett und Robson (2011)

Aus **Tabelle 59** geht hervor, dass eine Strukturvielfalt wie sie *H. hirsutum* aufweist bislang nur für *H. attenuatum* (Sektion 9) und *H. sampsonii* (Sektion 9c) beschrieben ist. Diese Tatsache lässt eine chemotaxonomische Nähe der Arten vermuten, die sich bei der Ordnung der Sektionen nach morphologischen und geographischen Aspekten nicht im gleichen Maße widerspiegelt (**Abbildung 140**). Ein deutlicher Unterschied besteht allerdings in der Acylseitenkette. Während es bei *H. hirsutum* ausschließlich zum Einbau aliphatischer Startersäuren kommt, sind bei *H. attenuatum* und *H. sampsonii* weitaus häufiger aromatische Startersäuren an der Biosynthese beteiligt.

Insgesamt zeichnet sich ab, dass die in dieser Arbeit gefundenen Strukturklassen hauptsächlich in Sektionen, die sich aus Sektionen 3 oder 7 entwickelten, zu finden sind. Eine Ausnahme stellen das aus *H. sinaicum* isolierte **Sinaicinon** und die für *H. hypericoides* beschriebenen Vertreter

vom B I-Typ, **17-Hydroxy-7-epi-Clusinanon** und **18-Acetoxyclusianon**, dar. Verwunderlich erscheint allerdings, dass für *H. ascyron*, eine der beiden Arten der Sektion 7 *Roscyna*, bislang ausschließlich monozyklische Acylphloroglucinole beschrieben wurden. Die meisten der gefundenen Derivate lassen sich der Klasse der Spiro-Verbindungen zuordnen (Hashida et al. 2008b; Zhu et al. 2015a), die sonst nur in *H. riparium* (Sektion 1) (Tala et al. 2015), *H. beanii*, *H. chinese* und *H. henryi* (Sektion 3) (Chen et al. 2011; Abe et al. 2012; Yang et al. 2015) und *H. geminiflorum* (Sektion 4) (Wu et al. 2008) gefunden wurden.

Wie oben erwähnt, konnten aus *H. scabrum* vielfältige Vertreter der bizyklischen polyprenylierten Acylphloroglucinole isoliert werden. Auch wird für diese *Hypericum*-Art ein trizyklisches Derivat mit einem Adamantan-Grundkörper beschrieben, **Hyperibon K**, welches sich aber von einem B I-Typ BPAP ableitet (Gao et al. 2016a).

Auch für Sektion 19 *Coridium*, der letzten Sektion der Hirtella-Gruppe, wurden bereits Acylphloroglucinole beschrieben. So konnten aus *H. jovis* bislang drei Vertreter isoliert werden, von denen zwei monozyklischer Natur sind und der dritte sich durch eine Chroman-Einheit auszeichnet (Athanasas et al. 2004). Das monozyklische Acylphloroglucinol **Empetrikathiforin** ist für *H. empetrifolium* bekannt (Schmidt et al. 2012a) und die beiden Chroman-Derivate **Hypercalyxone A** und **B** wurden aus *H. amblycalyx* isoliert (Winkelmann et al. 2003). In seiner Doktorarbeit beschreibt Schmidt (2013) weitere monozyklische und bizyklische Verbindungen mit einem Chroman bzw. Chromen-Grundgerüst, aber auch Acylphloroglucinole an die ein Monoterpen, so beispielsweise ein Limonen- oder Boran-Rest, angeknüpft ist, konnten aus dieser *Hypericum*-Art isoliert werden (Schmidt et al. 2012a).

Die bislang beschriebenen Acylphloroglucinole der Sektionen der Hirtella-Gruppe untermauern noch nicht die enge Verwandtschaft, die sich aufgrund morphologischer und geographischer Daten ergibt (**Abbildung 140**). Für eine abschließende Beurteilung der Abstammungen basierend auf chemotaxonomischen Aspekten ist es notwendig das Inhaltsstoffspektrum noch zahlreicher weiterer der über 400 *Hypericum*-Arten zu untersuchen.

Aufgrund der unübersichtlichen Vielzahl an Veröffentlichungen, kommt es nicht selten zur doppelten Vergabe von Trivialnamen für ein und dieselbe Struktur. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, das von Yang et al. (2018) gestartete Projekt einer Online-Datenbank fortzuführen (<http://www.chem.uky.edu/research/grossman/PPAPs>). In dieser Datenbank werden die identifizierten Acylphloroglucinole nach ihrer Struktur geordnet und der Trivialname, die Quelle, die optische Drehung sowie die Referenzen angegeben.

### 3 ZELLBIOLOGISCHE TESTUNG

#### 3.1 Material und Methoden

Zur Durchführung der allgemeinen zellbiologischen Arbeiten wurden zahlreiche Geräte benötigt und die Auswertung erfolgte mithilfe verschiedener Software-Programme, die in **Tabelle 60** aufgeführt sind. **Tabelle 61** fasst die verwendeten Verbrauchsmaterialien zusammen und in **Tabelle 62** sind die verschiedenen Medien und Pufferlösungen sowie deren Zusammensetzungen zu finden. Chemikalien, Lösungen und Geräte, die lediglich für eine explizite Testungsmethode Verwendung fanden, sind in jeweiligen Kapiteln zu finden.

##### 3.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien

###### 3.1.1.1 Geräte und Software

**Tabelle 60** Geräte und Software für die zellbiologischen Testungen

| Bezeichnung            | Modell  | Hersteller                                      |
|------------------------|---|---|
| <b>Autoklaven</b>      | Melag Autoklav 23   | Melag Medizintechnik,<br>Berlin (DE)            |
|                        | Varioklav 500   | HP Medizintechnik GmbH,<br>Oberschleißheim (DE) |
| <b>Inkubator</b>       | AutoFlow IR Direct Heat,<br>NU-5500 E<br>T = 37 °C, CO <sub>2</sub> = 5 % | Integra Biosciences GmbH,<br>Fernwald (DE)      |
| <b>Mikroskop</b>       | Olympus CKX41   | Olympus,<br>Tokyo (JP)                          |
| <b>Objektive</b>       | UPlanFLN 4x/0.13/PhP ∞/-/FN22   |   |
|                        | CAchN 10x/0.25/PhP ∞/-/FN22   |   |
|                        | LCachN 20x/0.40/PhP ∞/-/FN22  |   |
|                        | LCachN 40x/0.55/PhP ∞/-/FN22  |   |
| <b>Pipetten</b>        | 2,5 Reference (0,1 - 2,5 µL)  | Eppendorf,<br>Hamburg (DE)                      |
|                        | 10 Reference (2,5 - 10 µL)  |   |
|                        | 100 Research (10 - 100 µL)  |   |
|                        | 1000 Research (100 - 1000 µL)   |   |
|                        | 100 Research, 12-Kanal (10 - 100 µL)                                      |   |
| <b>Pipettierhelfer</b> | Accu-jet® pro   | Brand GmbH & Co.KG,<br>Wertheim (DE)            |

Fortsetzung Tabelle 60

|   |                                 |  |
|---|---------------------------------|--|
| <b>Plattenlesegerät</b>                             | Spectra FluorPlus               | Tecan,<br>Crailsheim (DE)                |
|   | Xfluor4 V 4.40 (Software)       |  |
| <b>Reinstwasseranlage</b>                           | Astacus LS                      | MembraPure,<br>Bodenheim (DE)            |
| <b>Software zur Erhebung biostatistischer Daten</b> | GraphPad Prism 5.03             | GraphPad Software Inc.,<br>La Jolla (US) |
|   | Microsoft Office Excel 2016     | Microsoft Corporation,<br>Redmond (US)   |
| <b>Trockenschrank</b>                               | 771 364                         | Memmert GmbH & Co. KG,<br>Schwabach (DE) |
| <b>Wasserbad</b>                                    | WB 22                           | Memmert GmbH & Co. KG,<br>Schwabach (DE) |
| <b>Werkbank, steril</b>                             | HeraSafe KS                     | Thermo Scientific,<br>Langenselbold (DE) |
| <b>Zentrifuge</b>                                   | Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech | Thermo Scientific,<br>Langenselbold (DE) |

## 3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 61 Verbrauchsmaterialien für die zellbiologischen Testungen

| Bezeichnung                                       | Modell  | Hersteller                             |
|---|---|--|
| <b>Kryovials</b>                                  | Cryo.S™ vials, 2 mL                           | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
| <b>Hämocytometer</b>                              | Hemocytometer disposable<br>Neubauer improved | NanoEnTek USA Inc.,<br>Pleasanton (US) |
| <b>Falcon-tubes</b><br><b>Zentrifugenröhrchen</b> | 15 und 50 mL<br>steril für die Zellkultur     | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
| <b>Kulturflaschen</b>                             | 75 cm <sup>2</sup>                            | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
|   | 150 cm <sup>2</sup>                           | TPP,<br>Trasadingen (CH)               |
| <b>Pasteurpipetten</b>                            | 230 mm  | VWR,<br>Darmstadt (DE)                 |
| <b>Pipetten, serologisch</b>                      | 5, 10 und 25 mL<br>steril                     | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
| <b>Pipettenspitzen</b>                            | 0,5 und 10 µL                                 | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
|   | 200 und 1000 µL                               | Sarstedt AG & Co.,<br>Nümbrecht (DE)   |
| <b>Reaktionsgefäße</b>                            | 0,5 mL  | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
|   | 1,5 und 2 mL                                  | VWR,<br>Darmstadt (DE)                 |
|   | 5 mL  | Eppendorf,<br>Hamburg (DE)             |
| <b>Zellkulturtestplatte</b>                       | 24-well Platte                                | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (DE) |
|   | 96-well Platte                                | TPP,<br>Trasadingen (CH)               |
| <b>Zellschaber, drehbar</b>                       | Länge: 300 mm<br>Schaberbreite: 20 mm         | TPP,<br>Trasadingen (CH)               |

### 3.1.1.3 Kulturmedien und sonstige Lösungen

**Tabelle 62** Kulturmedien als auch sonstige Lösungen und deren Zusammensetzung und das erworbene Hyperforin für die zellbiologischen Testungen

| Bezeichnung                           | Spezifizierung  | Hersteller                                |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>ECGM</b>                           | <b>Endothelial Cell Growth Medium</b>   | PeloBiotech GmbH,<br>Planegg (DE)         |
| <b>Supplement-Mix</b>                 | 2 % FKS<br>EndoCGS ( <b>Endothelial cell growth supplement</b> )/Heparin,<br>bFGF ( <b>basic Fibroblast Growth Factor</b> ),<br>EGF ( <b>Epidermal Growth Factor</b> ),<br>Hydrocortison,<br>Glutamin |   |
| <b>Antimykotikum</b>                  | 50 ng/mL Amphotericin B   | Biochrom AG,<br>Berlin (DE)               |
| <b>Antibiotikum</b>                   | 50 µg/mL Gentamicin   |   |
| <b>DMEM</b>                           | <b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b><br>+ 4,5 g/L D-Glucose & 2 mM Glutamin  | Gibco®,<br>Paisley (GB)                   |
| <b>RPMI 1640</b>                      | <b>Roswell Park Memorial Institute</b><br>2 g/L NaHCO <sub>3</sub> ,<br>mit und ohne Phenolrot  | Biochrom AG,<br>Berlin (DE)               |
| <b>L-Glutamin</b>                     | 200 mM  |   |
| <b>FKS<sub>hitzeinaktiviert</sub></b> | <b>Fetales Kälberserum Superior</b><br><i>Hitzeinaktivierung</i><br>30 Min im Wasserbad auf 56 °C erhitzen, auf RT abkühlen lassen, zu 50 mL aliquotieren und bei -20 °C lagern                       | Biochrom AG,<br>Berlin (DE)               |
| <b>DMSO</b>                           | Dimethylsulfoxid,<br>≥ 99,5 % für Molekularbiologie   | Carl Roth GmbH + Co.KG,<br>Karlsruhe (DE) |
| <b>M199</b>                           | Medium 199  | PAN GmbH,<br>Aidenbach (DE)               |
| <b>PBS</b>                            | Dulbecco's <b>phosphate buffer saline</b>   | Biochrom AG,<br>Berlin (DE)               |
| <b>Trypanblau</b>                     | 3,3'-Dimethyl-4,4'-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-disulfonaphtyl-3-azo)-[1,1'-bi-phenyl], dye content ~37 %<br><br>verwendete Lösung: 0,4 % (m/V) Trypanblau in PBS, sterilfiltriert, gelagert bei 4 °C    | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen (DE)        |



## ZELLBIOLOGISCHE TESTUNG

Fortsetzung Tabelle 62

|                           |   |   |
|---------------------------|---|---|
| <b>Trypsin/EDTA</b>       | Trypsin/EDTA Lösung<br>0,5 %/0,2 % in 10x PBS                           | Biochrom AG,<br>Berlin (DE)                       |
|                           | verwendete Lösung: 10 % (V/V) Trypsin/EDTA in PBS,<br>gelagert bei 4 °C |   |
| <b>Hyperforin</b>         | stabiles Dicyclohexylammoniumsalz<br>Charge: 7876                       | Phytolab GmbH & Co. KG,<br>Vestenbergsgreuth (DE) |
| <b>Kulturmedien für</b>   | <b>Bestandteile</b>   | <b>Volumen</b>                                    |
| <b>HMEC-1-Zellen</b>      | ECGM  | 500 mL  |
|                           | Supplement-Mix  | 27 mL   |
|                           | Antimykotikum/Antibiotikum  | 1,5 mL  |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 50 mL   |
| <b>HT-22-Zellen</b>       | DMEM  | 500 mL  |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 50 mL   |
| <b>RAW 264.7-Zellen</b>   | RPMI 1640   | 500 mL  |
|                           | (mit Phenolrot oder farblos)  |   |
|                           | L-Glutamin 200 mM   | 5,5 mL  |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 50 mL   |
| <b>Wegfriermedien für</b> | <b>Bestandteile</b>   | <b>Volumenanteile</b>                             |
| <b>HMEC-1-Zellen</b>      | ECGM  | 42 %  |
|                           | DMSO  | 8 %   |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 50 %  |
| <b>RAW 264.7-Zellen</b>   | RPMI 1640   | 70 %  |
|                           | DMSO  | 10 %  |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 20 %  |
| <b>HT-22-Zellen</b>       | DMEM  | 70 %  |
|                           | DMSO  | 10 %  |
|                           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 20 %  |
| <b>Weitere Medien</b>     | <b>Bestandteile</b>   | <b>Volumen</b>                                    |
| <b>Abstopppmedium</b>     | M199  | 500 mL  |
| für HMEC-Zellen           | FKS <sub>hitzeinaktiviert</sub>   | 50 mL   |

### 3.1.2 Verwendete Zelllinien

Für die umfangreiche zellbiologische Testung einiger isolierter Substanzen kamen drei verschiedene, adhärent wachsende Zelllinien zum Einsatz. Vor Verwendung der Zellen, wurden diese einer Testung auf Mykoplasmen unterzogen, die für alle ein negatives Ergebnis lieferte (Mycoplasmacheck, GATC Biotech, Konstanz, DE).

#### *HMEC-1-Zellen*

Für den MTT-, den Proliferations-, den Migrations- und auch den ICAM-1-Assay wurde die von Ades et al. (1992) etablierte HMEC-1-Zelllinie verwendet, wobei HMEC für **H**uman **M**icrovascular **E**ndothelial **C**ells steht. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um humane, dermale, mikrovaskuläre Zellen, die durch Transfektion mit einem PBR-322-Plasmid, welches ein Genprodukt des Simian-Virus 40 A enthielt, immortalisiert wurden. Die Zellen sind in der Lage, auf einen Entzündungsstimulus hin verstärkt das Oberflächenmolekül ICAM-1 zu exprimieren. Für die Bereitstellung dieser Zelllinie wird Dr. E. Ades und F.- J. Candel (CDC, USA) sowie Dr. T. Lawley (Emory University, USA) herzlichst gedankt.

#### *RAW-Zellen 264.7*

Die für den Griess- und den dazugehörigen MTT-Assay verwendeten RAW 264.7-Zellen sind murine Makrophagen, die mit dem Abelson Leukämievirus transfiziert und so immortalisiert wurden. Ihr Verhalten ist vergleichbar mit dem von „normalen“ Makrophagen, da sie zum Beispiel auch zur Pinozytose von Neutralrot, Phagozytose von Zymosan und Latexkügelchen als auch zur Neutralisierung von Tumorzellen befähigt sind (Raschke et al. 1978). Eine Besonderheit der Zelllinie besteht darin, dass durch bestimmte Stimuli (z. B. dem Lipopolysaccharid, einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, oder Cytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ) Stickstoffmonoxid nach außen abgegeben wird, welches Entzündungsreaktionen in Gang setzen kann.

### *HT-22-Zellen*

HT-22-Zellen sind ein glutamatsensitiver Subklon der HT-4 Zellen, die ursprünglich aus dem Hippokampus einer Maus isoliert wurden. Transfektion mit dem SV40 T-Antigen führte zur Immortalisierung der Zelllinie. Verwendung finden HT-22-Zellen in dieser Arbeit zur Untersuchung von neurotoxischen bzw. -protektiven Eigenschaften der Testsubstanzen. Die Zelllinie zeichnet sich vor allem durch den Mangel an ionotropen Glutamat-Rezeptoren aus (Davis und Maher 1994; Maher und Davis 1996).

### **3.1.3 Allgemeine Verfahren**

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden in einer Sterilbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Verbrauchsgegenstände und Glasgeräte wurden steril erworben oder zuvor in einem Autoklav dampfsterilisiert (121 °C, 1 bar, 120 Min) oder in einem Trockenschrank hitzesterilisiert (180 °C, 3 h). Alle Medien und sonstige Lösungen, außer der Trypsin/EDTA-Lösung wurden vor ihrer Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

#### **3.1.3.1 In-Kulturnahme der Zellen**

Alle verwendeten Zelllinien werden in Kryovials in Flüssigstickstoff bei -196 °C gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde der Inhalt eines Kryovials bei 37 °C möglichst schnell aufgetaut und mit etwa 8 mL des jeweiligen Kulturmediums in ein Falcon-Tube überführt. Dieses wurde zentrifugiert (5 Min und 1000 U/Min für HMEC-Zellen, 3 Min und 700 U/Min für RAW 264.7- und HT-22-Zellen) und der Überstand entfernt, um das im Wegfriermedium enthaltene DMSO abzutrennen. Den Wegfriermedien wird ein relativ hoher Anteil DMSO (8 - 10 % je nach Zelllinie) zugesetzt, um Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu verhindern, da dadurch die Zellen zerstört werden. Allerdings gelten solche hohen DMSO-Konzentrationen als zytotoxisch und sollten nicht zu lange auf die Zellen einwirken (Boxberger 2007). Anschließend wird das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gefüllt. Das Endvolumen an Medium in der Kulturflasche betrug für HMEC-Zellen 25 mL, für RAW 264.7 und HT-22-Zellen 20 mL. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

### 3.1.3.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden sowohl in den Kulturflaschen als auch in den Testplatten in einem Inkubator bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Zustand der Zellen und das Wachstum wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert.

### 3.1.3.3 Subkultivierung der Zellen (Passagieren)

#### *HMEC-1-Zellen*

Das verbrauchte Medium einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entfernt und der Zellrasen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 4 mL Trypsin/EDTA-Lösung und fünfminütiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen unter leichtem Klopfen vom Flaschenboden abgelöst. Bei Trypsin handelt es sich um eine Protease, die Peptidbindungen selektiv hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet und so zur Ablösung der Zellen von der Platte führt. Durch das zugesetzte EDTA wird Calcium gebunden, was zu einer Aufweichung von Zellhaftungs- und Zellstrukturen führt (Boxberger 2007). Um die proteolytische Aktivität des Trypsins auf die Zellen zu verringern, wurde die Zellsuspension sofort mit 40 mL Abstopppmedium versetzt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten mit 1000 U/Min zentrifugiert. Nach Entfernen des Abstopppmediums wurde der Zellkuchen in Kulturmedium resuspendiert, ein Aliquot je nach gewünschtem Verhältnis in eine Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) überführt und zu 25 mL mit ECGM-Medium verdünnt. Je nach Wachstum wurden die Zellen alle 3 bis 4 Tage passagiert. Für die durchgeführten Assays wurden Endothelzellen verwendet, die nicht älter als 12 Passagen waren.

#### *RAW 264.7-Zellen*

Für das Passagieren der murinen Zelllinie RAW 264.7 wurde ebenfalls das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden kam ein Zellschaber zum Einsatz, mit dem die Makrophagen in 10 mL frischem RPMI-Medium abgeschabt, gut suspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 700 U/Min wurde der Überstand abgesaugt und der Zellkuchen in 10 mL Kulturmedium aufgenommen. Je nach Splittungsverhältnis (i. d. R. 1:10 oder 1:20)

wurden Aliquote der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gegeben und mit frischem Kulturmedium auf 20 mL aufgefüllt. Das Passagieren wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Für den Griess-Assay wurden RAW 264.7-Zellen bis Passage 30 verwendet.

### HT-22-Zellen

HT-22 Zellen wurden ebenfalls alle 2 bis 3 Tage passagiert. Hierfür wurde zunächst das alte Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 Minute in den Inkubator gestellt. Durch leichtes Klopfen gegen die Flaschenwand konnten die Zellen abgelöst werden. Um die Konzentration an Trypsin und dessen Einfluss auf die Neuronenzellen herabzusetzen, wurden 9 mL DMEM-Medium hinzugefügt und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde 3 Minuten bei 700 U/Min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands konnten die Zellen in 5 mL Kulturmedium resuspendiert werden. 0,5 bzw. 1 mL wurden in eine neue Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) gegeben und auf 20 mL mit Medium verdünnt.

#### 3.1.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellsuspension wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit Kulturmedium verdünnt. Danach schloss sich ein weiterer Verdünnungsschritt, abermals 1:2, mit Trypanblau-Lösung an. Der anionische Diazofarbstoff wird nur von toten oder perforierten Zellen aufgenommen und bindet an zytosolische Proteine, wodurch diese Zellen blau gefärbt erscheinen (Boxberger 2007). Anschließend wurden 10 µL der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen aller vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl/mL wurde gemäß folgender Formel berechnet:

**Formel 5** Berechnung der Zellzahl pro mL

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Zellen der 4 Großquadrate}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 5 kann folgendermaßen vereinfacht werden:

**Formel 6** Vereinfachte Formel

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \text{Zellen der 4 Großquadrate} \times 10^4$$

### 3.1.3.5 Kryokonservierung der Zellen

Um Zellen dauerhaft zu lagern, müssen regelmäßig Kryovials mit einer gewissen Anzahl an Zellen weggefroren werden. Verwendung finden hierbei Zellen mit möglichst geringer Passage.

#### *HMEC-1-Zellen*

Für die Kryokonservierung wurden HMEC-1-Zellen in einer großen Kulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) bis zur Konfluenz kultiviert. Analog der Subkultivierung wurden die Zellen aus der Flasche gelöst und anschließend in 6 mL Wegfriermedium für HMEC-1-Zellen suspendiert. Die Zellsuspension wurde in vier Kryovials gleichmäßig portioniert, über 24 Stunden in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Dieses Vorgehen stellt einen schonenden Einfriervorgang mit einer Abkühlrate von 1 °C pro Minute sicher. (Boxberger 2007)

#### *RAW 264.7-Zellen*

Die RAW 264.7-Zellen wurden für die Kryokonservierung zunächst gemäß der Vorschrift für die Subkultivierung behandelt und die Zellzahl der Suspension bestimmt. Nach erneutem Abzentrifugieren des Mediums wurden die Zellen in Wegfriermedium für RAW 264.7-Zellen wiederaufgenommen und in Kryovials mit etwa  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Vial aliquotiert. Entsprechend den Endothelzellen HMEC-1 wurden die Vials bei -80 °C eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### *HT-22-Zellen*

Entsprechend den murinen Makrophagen RAW 264.7 wurde auch bei den Neuronenzellen HT-22 zunächst die Zellzahl bestimmt und die Zellen schließlich in Wegfriermedium für HT-22-Zellen resuspendiert. Es wurden Aliquote zu  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen pro Kryovial angefertigt. Wie die anderen Zelllinien wurde auch diese zunächst in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und anschließend zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.1.3.6 Herstellen der Untersuchungslösungen

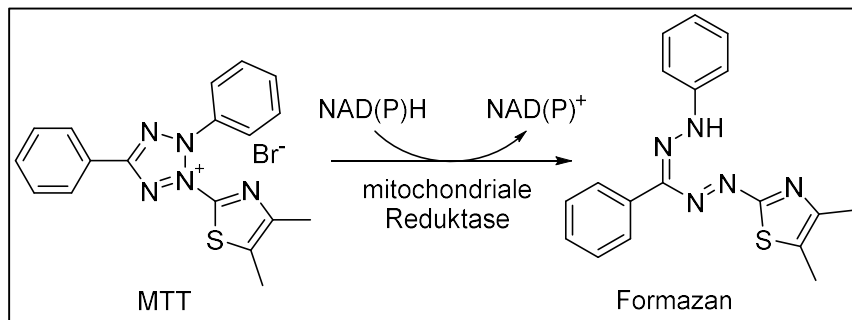
Für die zellbiologischen Untersuchungen wurden Stammlösungen der zu testenden Substanzen mit DMSO in einer Konzentration von 50 mM angefertigt und bei -20 °C gelagert. Das erworbene Hyperforin enthielt einen natürlichen Anteil an Adhyperforin (in der vorliegenden Charge 17,10 %). Für die Stammlösung wurde eine 50 mM-Lösung an Gesamthyperforin hergestellt. Nach dem Auftauen wurden die Stammlösungen entsprechend der benötigten Menge 1:100 mit dem jeweiligen Kulturmedium verdünnt, wodurch eine 0,5 mM Lösung der Testsubstanzen vorlag, die in die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass die DMSO-Konzentration sowohl für die HMEC-1- als auch für die RAW 264.7-Zellen nie über 0,1 % und für die HT-22-Zellen nie über 0,05 % lag.

### 3.1.4 Durchgeführte Assays

#### 3.1.4.1 MTT-Assay

##### *Grundlage*

Der MTT-Assay wird durchgeführt, um mögliche toxische Effekte von Substanzen auf Zellen abschätzen zu können. Das bei dem Versuch eingesetzte gelbe Tetrazoliumsalz, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) ist wasserlöslich und kann von den Zellen aufgenommen werden. Von der Succinat-Reduktase in der Atmungskette der Mitochondrien und Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums wird es mithilfe von NADPH bzw. NADH zum wasserunlöslichen, blau gefärbten Formazan reduziert (**Abbildung 141**) und reichert sich in den Zellen an. Nach Auflösen der Zellen und Freisetzen der Formazankristalle kann die Lösung photometrisch vermessen werden. Man setzt dabei voraus, dass die Umsetzung des Reagenzes proportional zur Viabilität der Zellen ist. Entsprechend Berridge et al. (2005) ist das Ergebnis des Assays jedoch nicht direkt an die Anzahl lebensfähiger Zellen gebunden, sondern spiegelt vielmehr die Gesamtheit der Enzymaktivität wieder. Diese Tatsache muss bei der Aus- und Bewertung der Daten eingeschlossen werden.



**Abbildung 141** Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zum entsprechenden blau gefärbten Formazan durch mitochondriale Reduktasen

Auf Grundlage dieses Assays sollen die Substanzkonzentrationen für die anderen Testsysteme (z. B. ICAM-1-Assay, Proliferationsassay) festgelegt und falsche Ergebnisse durch Toxizität der Substanzen vermieden werden. Es wurden daher in der Regel nur Konzentrationen verwendet, bei denen die Viabilität im MTT-Assay über 90 % lag.

### *Versuchsdesign*

Die Durchführung des MTT-Assays entspricht einer modifizierten Vorgehensweise nach Mosmann (1983).

#### Aussäen der Zellen und Substanzaufgabe

Für den Assay wurden die Zellen einer Kulturflasche wie bereits beschrieben geerntet, die Zellzahl bestimmt und eine Suspension mit  $9 \times 10^5$  HMEC-1-Zellen/mL hergestellt.  $9 \times 10^4$  HMEC-1-Zellen (100  $\mu$ L) wurden in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und 24 Stunden lang inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte). Zur Vermeidung von Randeffekten wurden die außenliegenden Wells mit PBS-Puffer befüllt. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch 100  $\mu$ L der jeweiligen Verdünnungen der Testsubstanzen ersetzt. Es wurden die Konzentrationen 50, 25, 12,5 und 6,25  $\mu$ M aus einer 50 mM Stammlösung hergestellt.

#### MTT-Aufgabe und Lösen der entstandenen Formazankristalle

Nach Substanzaufgabe wurden die Zellen wieder 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt und durch 100  $\mu$ L einer frisch zubereiteten 10%igen (V/V) MTT-Lösung in Kulturmedium ausgetauscht. Nach dreistündiger Inkubation im Inkubator wurde



die Lösung wieder vorsichtig abgesaugt und die Wells mit 100  $\mu$ L einer 10%igen SDS-Lösung beschickt.

**Tabelle 63** Chemikalien und Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen für den MTT-Assay

| Bezeichnung | Spezifizierung   | Hersteller                         |
|-------------|--|------------------------------------|
| <b>MTT</b>  | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, ~98 %  | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen (DE) |
|             | Stammlösung: 4 mg/mL MTT in PBS, sterilfiltriert, gelagert bei -20 °C<br>verwendete Lösung: 1:10 mit Kulturmedium verdünnt |                                    |
| <b>SDS</b>  | Natriumdodecylsulfat,<br>92,5-100,5 %  | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen (DE) |
|             | verwendete Lösung: 10 % (m/V) SDS in Reinstwasser, sterilfiltriert,<br>gelagert bei RT                                     |                                    |

#### Messung der Absorption und Auswertung

Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt, damit sich die entstandenen Formazankristalle lösen, und anschließend bei 560 nm photometrisch vermessen. Die gemessene Absorption der behandelten Zellen wurde prozentual auf die Absorptionswerte der unbehandelten Zellen, welche nur mit Kulturmedium für HMEC-1 inkubiert wurden bezogen und in Prozent Viabilität angegeben. Als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen aus sechs Wells mit der höchsten Konzentration an Lösungsmittel (hier 0,1 % DMSO) versetzt, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen.

### 3.1.4.2 Proliferations-Assay

#### 3.1.4.2.1 Bildung neuer Blutgefäße

Die Blutgefäße des menschlichen Körpers, sowohl die Arterien als auch die Venen, sind aus drei unterschiedlichen Gewebsschichten zusammengesetzt (Klinke et al. 2010).

Nach außen hin wird das Gefäß von der Tunica externa, auch als Adventitia bezeichnet, abgeschlossen. Diese besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und dient der Verankerung in der Umgebung.

Danach schließt sich die Tunica media (Media) an, die aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern aufgebaut ist. Ihre Aufgabe besteht in der Regulation der Gefäßweite und passt sich somit dem Pulsschlag und dem Blutdruck an.

Die innerste Schicht wird Tunica intima oder kurz Intima genannt. Sie weist eine einlagige Schicht aus flachen Zellen, den sogenannten Endothelzellen auf und ist für den Stoff- und Gasaustausch zwischen Blut und Gefäßwand zuständig.

Somit führt die Proliferation von Endothelzellen, d.h. sowohl das Wachstum als auch die Vermehrung durch Zellteilung, zur Bildung von Gefäßen des Herz-Kreislauf-Systems, wobei zwei Vorgänge unterschieden werden müssen (Klinke et al. 2010):

#### *Vaskulogenese*

Dieser Terminus umfasst die *de novo* Bildung von Blutgefäßen und findet vor allem in der frühen Embryogenese zur Ausbildung eines Blutnetzwerkes statt. Aber auch im Blut Erwachsener konnten so genannte EPCs (engl. Endothelial Progenitor Cells), die endothelialen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark stammen, nachgewiesen werden. (Kalka et al. 2000; Joussen et al. 2003)

#### *Angiogenese*

Mit dem Begriff Angiogenese wird die Bildung von Blutgefäßen aus bereits vorhandenen beschrieben. Es können zwei Variationen unterschieden werden, die Sprossung von Kapillaren („sprouting“) und die Teilung durch transkapilläre Pfeiler (Intussuszeption) (Carmeliet 2000). Dabei wird diese Neubildung durch ein diffiziles System aus Angiogenese-hemmenden und -fördernden Faktoren ausgelöst (Folkman und Klagsbrun 1987; Carmeliet 2003).

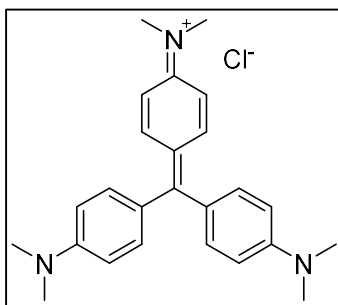
Physiologische Bedeutung hat die Bildung von neuen Blutgefäßen im adulten Organismus nur im Ovarialzyklus, bei der Follikelreifung, Corpus-luteum Entwicklung und dem Aufbau der Uterusschleimhaut. Somit ist die Reaktivierung der Angiogenese immer mit pathologischen Prozessen,

wie der Tumorbildung, der Wundheilung oder der Gewebeischämie verbunden. (Ausprunk und Folkman 1977; Kalka et al. 2000; Tahergorabi und Khazaei 2012) Zur Regeneration von Gewebeabschnitten ist die Neubildung von Blutgefäßen ein erwünschter Prozess, wohingegen sie bei der Tumorbildung eine gute Versorgung der Wucherung sicherstellt und damit ein noch schnelleres Wachstum ermöglicht, was nicht erstrebenswert ist (Nishida et al. 2006; Folkman 2007; Zündorf und Dingermann 2007).

### 3.1.4.2.2 Versuchsdurchführung

#### Grundlage

Mit dem Proliferations-Assay, häufig auch als Kristallviolett-Assay bezeichnet, soll der Einfluss der Substanzen auf die Vermehrung der Zellen untersucht werden. Hierfür werden die Zellen subkonfluent ausgesät und eine definierte Zeit kultiviert. Anschließend werden sie mit Kristallviolettlösung gefärbt. Bei Kristallviolett (**Abbildung 142**) handelt es sich um einen basischen Farbstoff, der die DNA-Abschnitte färbt, welche nicht mit Histonen assoziiert sind (Noeske 1966). Je mehr Zellen vorhanden sind, desto bedeutet je weniger ausgeprägt die Proliferation gehemmt wird, desto mehr DNA wird angefärbt und desto intensiver blau erscheint die zu vermessende Lösung.



**Abbildung 142** Kristallviolett (= Gentianaviolett)

Eine Hemmung der Proliferation von Endothelzellen gibt Hinweis auf eine mögliche antiangiogenetische Aktivität der Substanzen, das heißt das Entstehen neuer Blutgefäßen aus bereits Bestehenden wird vermindert.

### *Versuchsdesign*

#### Aussäen der Zellen

Für diesen Assay wurden 100 µL einer Zellsuspension mit  $1,5 \times 10^4$  Zellen/mL in die innenliegenden Wells einer 96-Well-Platte ( $1,5 \times 10^3$  Zellen/Well) ausgesät. Auch hier wurden die Wells am Rand der Platte mit 100 µL PBS beschickt.

#### Substanzaufgabe und Färben der Platten

Nach 24stündiger Wachstumsphase im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchte) wurde das Medium einer Referenzplatte (12 Wells) abgesaugt, die Zellen mit 100 µL Kristallviolettlösung 10 Minuten gefärbt und anschließend mit Reinstwasser gründlich gewaschen. Diese Wells liefern einen Basislinienwert (Proliferation = 0 %), ab dem die Proliferation betrachtet wurde.

Die Testplatten wurden mit 100 µL der Untersuchungslösungen in doppelter Endkonzentration versetzt, sodass 200 µL Lösung je Well vorhanden waren. Untersucht wurden die Konzentrationen 50, 25, 12,5 und 6,25 µM bzw. 20, 10, 5 und 1 µM ( $c_{\text{end}}$ ). 72 Stunden wurden diese Ansätze bei oben genannten Bedingungen gelagert und anschließend, wie bereits für die Referenzplatte beschrieben, gefärbt und gewaschen.

#### Lösen der gefärbten Zellen, Messung der Absorption und Auswertung

Nach dem Trocknen aller Platten wurden 100 µL Citratpuffer je Well zugegeben und die Absorption bei 560 nm am Plattenlesegerät vermessen. Prozentual bezogen wurden die gemessenen Absorptionen auf eine Kontrollgruppe, die nur mit Medium behandelt wurde (Proliferation = 100 %). Eine Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) wurde ebenfalls durchgeführt.

## ZELLBIOLOGISCHE TESTUNG

**Tabelle 64** Chemikalien und Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen für den Proliferations-Assay

| Bezeichnung            | Spezifizierung  | Hersteller               |
|------------------------|---|--------------------------|
| <b>Kristallviolett</b> | Tris(4-dimethylaminophenyl)methylum-chlorid                                     | Merck,<br>Darmstadt (DE) |
|                        | verwendete Lösung: 0,5 % (m/V) in Methanol 20 % (V/V),<br>gelagert bei RT       |                          |
| <b>Na-Citrat</b>       | Tri-Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O, p.a.                                    | Merck,<br>Darmstadt (DE) |
|                        | verwendete Lösung: 0,05 M Natriumcitrat in EtOH (50 % (V/V),<br>gelagert bei RT |                          |

### 3.1.4.3 Migrations-Assay

#### 3.1.4.3.1 Angiogenetische Kaskade

Bei dem Vorgang der Angiogenese handelt es sich um eine Kaskade, die durch die Bindung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren an spezifische Oberflächenrezeptoren der Endothelzellen ausgelöst wird. Der Prozess startet sodann mit einer Vasodilation und dem Austritt von Plasma-proteinen, die den migrierenden Endothelzellen als Gerüst dienen. Durch die Aktivierung der Endothelzellen kommt es zum örtlichen Abbau der Basalmembran dieser Gefäße. Daraufhin beginnt die Proliferation der Zellen, das heißt zum einen Wachstum, aber auch Vermehrung durch Zellteilung. Schließlich wandern die Zellen in den perivaskulären Raum in Richtung des angiogenetischen Stimulus, der von dem erkrankten Gewebe ausgeschüttet wird. Dies führt zur Ausbildung von endothelialen Sprossen und letztlich zu neuen Blutgefäßen. (Madeddu 2005; Koltermann 2008)

Ein Überblick über die unterschiedlichen Ansatzpunkte für die Inhibierung der verschiedenen Transduktionswege, die bei der komplexen Kaskade der Angiogenese relevant sind, wird von Albini et al. (2007) beschrieben.

#### 3.1.4.3.2 Versuchsdurchführung

##### *Grundlage*

Mit dem Migrations-Assay (auch als Wound-healing-Assay bezeichnet) soll die Fähigkeit der Zellen in einen zellfreien Spalt zu wandern evaluiert werden. Dafür wird ein konfluent bewachsener Zellrasen beschädigt und der freie Spalt, sowohl sofort nach der Verletzung als auch nach 16 Stunden ausgemessen.

##### *Versuchsdesign*

Als Grundlage für die Durchführung des Migrations-Assay diene zum einen das Protokoll von Koltermann (2008), zum anderen die modifizierte Vorschrift von Schmidt (2013).

##### Coaten der Wells mit Kollagen G und aussäen der Zellen

Zunächst wurde Kollagen G-Lösung in die Wells einer 24-Well-Platte gegeben und ca. 30 Minuten im Inkubator stehen gelassen. Anschließend wurde die Kollagen-Lösung vorsichtig abgesaugt und durch Kulturmedium ersetzt. Dieser Ansatz wurde zur Äquilibration 15 Minuten bei 37 °C

inkubiert. Nach Absaugen des Überstands konnten die Zellen ausgesät werden und die Platten verblieben bis zur Konfluenz der Zellen im Inkubator.

#### Verletzung des Zellrasens und Substanzaufgabe

Die Verwundung des dicht bewachsenen Zellrasens erfolgte mithilfe einer 100 µL-Pipettenspitze, die in einer geraden Linie quer durch jedes Well gezogen wurde. Um saubere „Wundränder“ zu erhalten, wurden immer neue Spitzen benutzt. Die verletzte Zellschicht wurde zwei Mal mit PBS gewaschen um Zellfragmente zu entfernen. Nach Entfernen der Waschlösung wurden je zwei Wells mit 500 µL ECGM (Negativkontrolle), M199 (Positivkontrolle) oder den Untersuchungslösungen befüllt. Eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 % DMSO wurde ebenfalls durchgeführt.

#### Auswerten der Platten

Nach 19-stündiger Inkubation wurde der freie Spalt kontrolliert und Aufnahmen mit dem Mikroskop PrimoVert (Zeiss, Göttingen, DE) gemacht.

**Tabelle 65** Chemikalien und die Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen für den Migrations-Assay

| Bezeichnung       | Spezifizierung  | Hersteller                  |
|-------------------|---|-----------------------------|
| <b>Kollagen G</b> | Kollagen G aus bovinem Kälberserum<br>4 mg/mL in HCl                          | Biochrom AG,<br>Berlin (DE) |
|                   | verwendete Lösung: 0,25 % (V/V) Kollagen G in kaltem PBS und sofort verwenden |                             |

### 3.1.4.4 ICAM-1-Assay

#### 3.1.4.4.1 Die Rolle des Oberflächenmoleküls ICAM-1 in Entzündungsprozessen

Entzündungsreaktionen im menschlichen Organismus stellen eine Kaskade verschiedener Ereignisse dar, die von der Wahrnehmung und „Meldung“ der eingedrungenen Noxe über die Migration von Immunzellen aus Blutgefäßen an den betroffenen Zielort bis hin zur Bekämpfung und Beseitigung des Fremdstoffes reicht. (Cronstein und Weissmann 1993; Mutschler et al. 2007)

Im Folgenden soll in Hinblick auf die hier durchgeführten *in-vitro* Testungen, die Rolle der Zellaadhäsionsmoleküle bei der Aktivierung von Leukozyten beleuchtet werden. Aufgrund der Komplexität der ablaufenden Vorgänge sollen diese nur grob umrissen werden und dienen als ausschnittsweiser Überblick.

Adhäsive Wechselwirkungen zwischen Zellen oder Zellen und Molekülen der extrazellulären Matrix haben große Bedeutung in vielen biologischen Vorgängen, wie der Erkennung und Kontaktaufnahme von Zellen, der Differenzierung und Proliferation von Zellen, der Entwicklung des Embryos, der Immunreaktion und auch der Blutbildung. In Hinblick auf Entzündungsreaktionen und damit verbundener Immunantwort mittels Extravasation von Leukozyten müssen drei wichtige Gruppen von Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules CAM*) vorgestellt werden. (van de Stolpe und van der Saag 1996)

#### Die Selektine = primäre Adhäsionsmoleküle

Diese Gruppe vereint nur drei Mitglieder: Das Leukozyten-Selektin (L-Selektin, CD62L), das Plättchen-Selektin (P-Selektin, CD62P) und das Endothel-Selektin (E-Selektin, CD62E). L-Selektin ist, wie der Name schon sagt, in unterschiedlichem Ausmaß auf den weißen Blutkörperchen zu finden, wohingegen E- und P-Selektin von angeregten Endothelzellen exprimiert werden. Außerdem erscheint das P-Selektin auch auf der Oberfläche aktivierter Blutplättchen. (Ley et al. 2007) Ein Unterschied zwischen dem E- und dem P-Selektin besteht darin, dass das P-Selektin in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und den Granula der Plättchen gespeichert wird und innerhalb von Minuten auf der Oberfläche von aktivierten Zellen erscheinen kann, dagegen muss das E-Selektin bei Aktivierung der Endothelzellen neu synthetisiert werden und wird erst innerhalb von zwei Stunden auf der Oberfläche exprimiert (McEver 2002; Chavakis et al. 2009).



Ein Ligand aller Selektine ist der P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL1), welcher vor allem auf aktivierten Leukozyten, aber auch auf Endothelzellen zu finden ist. Durch Bindung dieses Liganden an die Selektine des Endothels, kommt es zum Abbremsen und Anbinden („Tethering“) der fließenden Leukozyten. Da es sich hierbei um eine relativ schwache Wechselwirkung handelt, erlaubt sie ein Rollen („Rolling“) der Zellen über die Endotheloberfläche (McEver und Cummings 1997; Ley et al. 2007). Diese Rollbewegung der Zellen ermöglicht die Bindung von Chemokinen, die auf einen inflammatorischen Stimulus hin auf der Endotheloberfläche zu finden sind, an entsprechende Chemokin-Rezeptoren der Leukozyten, was eine Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrinen der weißen Blutkörperchen zur Folge hat. (Chavakis et al. 2009)

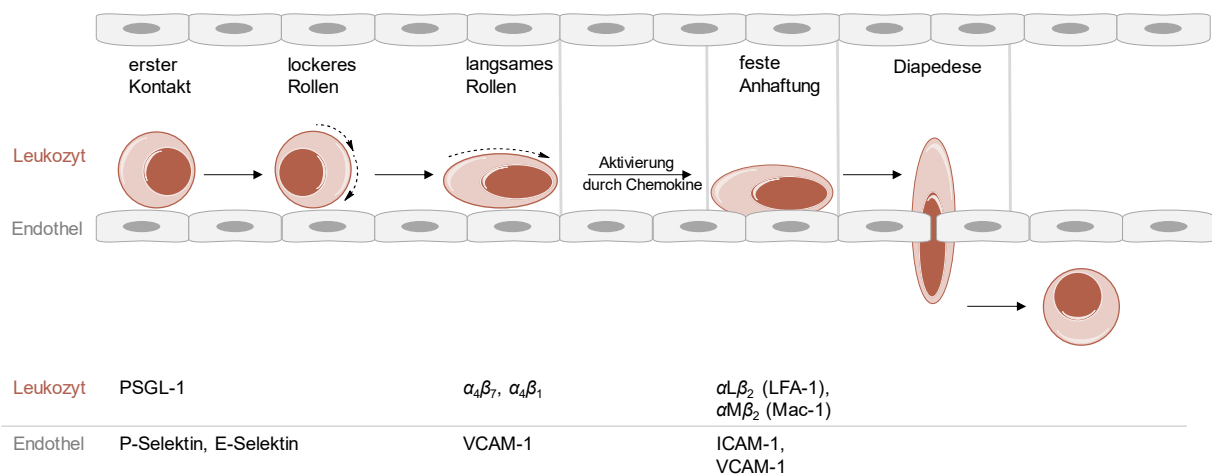
#### Die Integrine = sekundäre Adhäsionsmoleküle

Bei dieser Gruppe von Adhäsionsmolekülen handelt es sich um dimere Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Zahlreiche dieser Transmembranproteine mit vielfältigen Aufgaben sind bekannt, wobei an der festen Bindung von Leukozyten an das Endothel nur die beiden  $\alpha_4$ -Integrine,  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) und  $\alpha_4\beta_7$ , und zwei  $\beta_2$ -Integrine,  $\alpha_L\beta_2$ , das LFA-1 (Leukozyten funktionsassoziiertes Antigen, CD11a/CD18) und  $\alpha_M\beta_2$ , das Mac-1 (Makrophage-1 Antigen, CD11b/CD18), beteiligt sind. Die  $\alpha_4$ -Integrine verlangsamen das Rollen der Leukozyten durch Bindungen an VCAM-1 (siehe unten), wohingegen die  $\beta_2$ -Integrine erst später eine Rolle spielen und zum dauerhaften Anhaften der Leukozyten an das Endothel führen. Mittels Chemokin-induzierter Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine kommt es zur Konformationsänderung der Adhäsionsmoleküle, wodurch sich die Affinität zu den entsprechenden Liganden auf den Endothelzellen drastisch erhöht. Bindungspartner der Integrine sind wiederum Adhäsionsmoleküle, die allerdings der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet sind.

#### Die Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Diese dritte Gruppe an Adhäsionsmolekülen ist aus einer variablen Zahl an Immunglobulin(Ig)-ähnlichen Domänen aufgebaut (Cronstein und Weissmann 1993), wobei diese je nach Ähnlichkeit der IgSFs mit der variablen Region, mit der konstanten Region oder mit der schweren Kette (heavy-chain) eines Immunglobulins in V-, C- und H-Typ untergliedert werden (Hunkapiller und Hood 1989; Cronstein und Weissmann 1993). Die für die feste Bindung der Leukozyten verantwortlichen Moleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, CD106) gehören dem H-Typ an. Nach Anheften der Leukozyten an das

Endothel schließt sich die Migration der Leukozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebe (Diapedese) an. Diese kann an den Zellen vorbei (parazellulär) oder durch eine Zelle hindurch (transzellulär) erfolgen. Wobei der transzelluläre Transport ebenfalls durch das Immunglobulin ICAM-1 durch Bildung von Kanälen in der endothelialen Zellmembran vermittelt wird. (Ley et al. 2007)



**Abbildung 143** Der Prozess der Extravasation der Leukozyten in Anlehnung an Rink et al. (2012)

ICAM-1 besitzt fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen vom H-Typ, bezeichnet als D1 bis D5. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 wird bei Bedarf auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert und kann im Falle einer Entzündungsreaktion durch viele Substanzen, unter anderem  $\text{TNF-}\alpha$ , hochreguliert werden (Roebuck und Finnegan 1999). Hauptakteur ist dabei der nukleäre Faktor kappa B ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ). Der Transkriptionsfaktor besteht aus zwei Untereinheiten p65 und p50 und wird zum einen durch Zytokine ( $\text{IL-1}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ) und Pathogene (LPS), zum anderen auch durch Zellschäden und Stress aktiviert. Aktivierung bedeutet die Phosphorylierung des Inhibitors von  $\kappa\text{B}$  ( $\text{I-}\kappa\text{B}$ ), an den Faktor, der in seiner inaktiven Form als Dimer gebunden vorliegt. Dies geschieht durch den IKK Komplex ( $\text{I}\kappa\text{B}$  kinase complex). In Folge dessen kommt es zur Freisetzung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und zum Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}$  durch Ubiquitinierung und Proteolyse. (Tak und Firestein 2001; Oeckinghaus et al. 2011)  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  transloziert aus dem Zytoplasma in den Zellkern und bindet an seine Promotorregion, welche die Transkription von Genen reguliert, die Entzündungen, Immunantwort, Apoptose und Zelldifferenzierung bewirken. (Beg et al. 1992; Roebuck und Finnegan 1999; Tak und Firestein 2001; Oeckinghaus et al. 2011)

### 3.1.4.4.2 Versuchsdurchführung

#### *Grundlage*

Mit dem ICAM-1-Assay wird auf eine mögliche antiphlogistische Aktivität der isolierten Substanzen getestet. Das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) wird auf einen Stimulus hin von verschiedenen Zelltypen, darunter Endothelzellen, auf deren Oberfläche exprimiert. Mit einem Fluoreszenz-markierten ICAM-1-Antikörper kann die Menge an ICAM-1 „sichtbar“ gemacht und mittels Durchflusszytometrie und FACS ermittelt werden. Je mehr ICAM-1 vorhanden ist, desto ausgeprägter ist die „Entzündung“.

#### *Versuchsdesign*

##### Aussäen der Zellen

Eine konfluent bewachsene Kulturflasche wurde 1:3 gesplittet. Dafür wurde das Zellpellet in 9 mL Kulturmedium aufgenommen und 3 mL dieser Zellsuspension mit 10 mL ECGM-Medium verdünnt. 500 µL der verdünnten Zellsuspension wurden in die Wells einer 24-Well-Platte gegeben und über 48 Stunden bis zur Konfluenz im Inkubator kultiviert.

##### Substanzaufgabe und Stimulierung der ICAM-1-Expression mit TNF- $\alpha$

Nach Entfernen des Zellkulturmediums erfolgten zunächst ein Waschschrift mit PBS und anschließend die Zugabe von 500 µL verschiedener Lösungen der zu untersuchenden Substanzen. Getestet wurden entsprechend dem MTT-Assay die Konzentrationen 50, 25, 12,5 und 6,25 µM bzw. 5, 2,5, 1 und 0,5 µM. 30 Minuten nach Aufgabe der Testsubstanzen erfolgte die Stimulation mit 5 µL TNF- $\alpha$ -Lösung ( $c_{\text{end}} = 10 \text{ ng/mL}$ ). Mitgeführt wurden stets drei Kontrollen. Zwei Wells mit reinem Zellkulturmedium, die im weiteren Versuchsablauf nicht mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, um einen Wert für die natürliche ICAM-1 Expression der HMEC-1 Zellen zu erhalten. Zwei weitere Wells wurden mit 500 µL ECGM-Medium versetzt und mit TNF- $\alpha$  stimuliert (Negativkontrolle). Dies entspricht der maximalen ICAM-1 Expression und dient in der Auswertung als 100 % Wert. Als Positivkontrolle wurde in zwei weiteren Wells den 500 µL Kulturmedium 5 µL Parthenolid ( $c_{\text{end}} = 5 \text{ µM}$ ) hinzugefügt und ebenfalls mit TNF- $\alpha$  stimuliert.

Aufarbeitung der Zellen

Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände entfernt, mit PBS gewaschen, jedes Well mit 200 µL Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und 3 Minuten inkubiert. Durch mehrmaliges, schnelles Aufziehen und Ausstoßen der Trypsin-Zell-Mischung mit der Pipette wurde das Ablösen der Zellen beschleunigt und diese in FACS Röhrchen überführt. Durch Suspendieren in der vorgelegten Formalin-Lösung (100 µL) wurden die Zellen fixiert. Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen durch Zugabe von 1000 µL PBS und kurzem Vortexen gewaschen und anschließend bei 1200 U/Min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellkuchen mit anheftendem Restvolumen wurde mit 5 µL Fluoreszenz markiertem ICAM-1 Antikörper versetzt und mit dem Vortexer geschüttelt. Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssigen Antikörper, der nicht an ICAM-1 Antigen gebunden wurde zu entfernen, schloss sich ein zweiter Waschschriff mit 1000 µL PBS (siehe oben) an. Der Überstand wurde wiederum durch Dekantieren entfernt und durch 400 µL frisches PBS ersetzt. Die aufgearbeiteten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie vermessen. Die Bestimmung der ICAM-1 Expression erfolgte für die Testsubstanzen, Negativ- und Positivkontrolle immer in Duplikaten und in drei unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 66** Chemikalien und Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen, Geräte und Software für den ICAM-1-Assay

| Bezeichnung                                | Spezifizierung   | Hersteller                          |
|--|--|-------------------------------------|
| <b>BSA</b>                                 | Bovines Serum Albumin<br>Fraktion V  | PAA Laboratories GmbH,<br>Linz (AT) |
| <b>FITC-markierter Antikörper (ICAM-1)</b> | FITC-markierter Mausantikörper (Fluorescein-Isothiocyanat) IgG1 gegen CD54 (ICAM-1)  | Biozol,<br>Eching (DE)              |
| <b>Parthenolid</b>                         | ≥ 97 %<br><br>Stammlösung: 100 mM in DMSO,<br>in 10 µL Aliquoten gelagert bei -80 °C<br>verwendete Lösung: 10 µL der Stammlösung werden mit 990 µL<br>Medium versetzt, gut gevortext und anschließend nochmals 1:2<br>mit Medium verdünnt (c = 0,5 mM) | Calbiochem,<br>Bad Soden (DE)       |

Fortsetzung Tabelle 66

|   |   |                                 |
|---|---|---------------------------------|
| <b>Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF-<math>\alpha</math>)</b> | $\geq 97$ %, rekombinant, human, <i>E. coli</i>   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE) |
|   | Stammlösung: 17 $\mu\text{g/mL}$ in 0,1%iger BSA-Lösung in PBS, in 10 $\mu\text{L}$ Aliquoten gelagert bei $-80^\circ\text{C}$<br>verwendete Lösung: 10 $\mu\text{L}$ der Stammlösung werden mit 160 $\mu\text{L}$ Medium versetzt und gut gevortex (c = 1 $\mu\text{g/mL}$ ) |                                 |
| <b>Durchflusszytometer</b>                                  | Becton Dickinson FacsCalibur <sup>IM</sup><br>CellQuestPro (Software)   | Becton Dickinson, Franklin (US) |
| <b>Formaldehydlösung</b>                                    | 10%ige Formaldehydlösung, phosphatgepuffert   | AppliChem GmbH, Darmstadt (DE)  |
| <b>FACS-Röhrchen</b>  | Polystyren Pound Bottom Tube, 5 mL  | Becton Dickinson, Franklin (US) |
| <b>Schüttler</b>  | Vortex mixer VV3  | VWR, Darmstadt (DE)             |
| <b>Software zur Auswertung</b>                              | WinMDI 2.9 (Windows Multiple Documents Interface for Flow Cytometry)  | entwickelt von Joe Trotter      |

Vermessung der Proben mittels FACS

Zur Ermittlung der ICAM-1 Expression wurden die Analysen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) vermessen. Mithilfe eines Durchflusszytometers erfolgt die Auftrennung der Zellen und der Zellfragmente nach Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (Seitenstreulicht, SSC). Durch den an das Oberflächenprotein ICAM-1 der intakten Zellpopulation gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde die ICAM-1 Expression indirekt als Fluoreszenzintensität bestimmt. Pro Testansatz wurden 3000 Zellen per FACS analysiert. Die entsprechenden Geräteeinstellungen sind in **Tabelle 67** wiedergegeben. Zunächst wurden die Daten mit der Software CellQuestPro prozessiert und anschließend mit der Software WinMDI 2.9 ausgewertet. Anhand der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der nur mit TNF- $\alpha$  behandelten Zellen wurde der 100 %-Wert für die ICAM-1-Expression ermittelt und alle anderen Ergebnisse prozentual darauf bezogen.

**Tabelle 67** Geräteeinstellungen des FACS

| Parameter                | Einstellung |
|--------------------------|-------------|
| Fluss                    | 60 µL/Min   |
| Anregungswellenlänge     | 495 nm      |
| Emissionswellenlänge     | 519 nm      |
| Vorwärtsstreulicht (FSC) | 0,1 V       |
| Seitenstreulicht (SSC)   | 320 V       |
| Spannung FL 1            | 500 V       |

### 3.1.4.5 Griess-Assay

#### 3.1.4.5.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO)

Die Bildung von NO-Radikalen im menschlichen Körper erfolgt über die Oxidation der Aminosäure L-Arginin mit molekularem Sauerstoff über das N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-Arginin zum L-Citrullin. Katalysiert wird diese Umsetzung durch das Enzym NO-Synthase, kurz NOS, von der drei Isoformen bekannt sind: die neuronale NOS (nNOS, NOS1) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS3) werden Calcium-abhängig konstitutiv exprimiert, wohingegen die Expression der induzierbaren NOS (iNOS, NOS2), wie der Name nahelegt, veranlasst wird und unabhängig von der Calciumkonzentration ist. (Förstermann et al. 1994; Clancy et al. 1998; Förstermann und Sessa 2011)

Mit Augenmerk auf pathologisch, entzündliche Prozesse ist vor allem das durch die iNOS in außerordentlich großen Mengen freigesetzte NO (Laroux et al. 2001; Guzik et al. 2003) von Bedeutung, welches als unspezifisches und toxisches Abwehrmolekül und Regulator der unspezifischen Immunabwehr fungiert (Bogdan 2001). Neben der vorrangigen Expression in Makrophagen (Stuehr et al. 1991), konnte diese auch für Monozyten (Hibbs et al. 1987), dendritische Zellen (Serbina et al. 2003; Tezuka et al. 2007), neutrophile Granulozyten (McCall et al. 1991), natürliche Killerzellen (Salvucci et al. 1998) und Epithelzellen (Kim et al. 2002) nachgewiesen werden. Bei der induzierten NO-Synthase erfolgt die Produktion des Enzyms in den Zellen erst auf einen externen Stimulus hin. Dabei kann es sich um bakterielles Lipopolysaccharid und/oder um proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\alpha\beta$  und IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , IL-2 und IL-10 handeln (Kilbourn und Belloni 1990; Hevel et al. 1991; Stuehr et al. 1991; Lowenstein et al. 1993; MacMicking et al. 1997; Alderton et al. 2001). Für eine aktive Form der iNOS muss das Enzym in ein Homodimer überführt werden. Für die Dimerisierung werden neben der Bindung von Calmodulin auch die Eingliederung einer Häm-Gruppe und möglicherweise Zinkionen benötigt. Durch die Bindung des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und des iNOS-Substrates L-Arginin wird das Dimer stabilisiert. Gehemmt werden kann die Dimerisierung und damit die Aktivität der iNOS durch den Proteininhibitor nNOS, das Makrophagenprodukt NAP110 und das ZNS-Protein Kalirin. (Bogdan 2001)

Der Beitrag des NOs zum entzündlichen Geschehen im Organismus ist zum einen sehr komplex, zum anderen paradox und soll hier nur kurz in Ausschnitten dargestellt werden. Bogdan (2001) berichtet von einer NO-vermittelten Hemmung der Adhäsion von Blutplättchen und Leukozyten an das Endothel. Dabei kommt es zur Downregulierung der endothelialen Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und ICAM-1, wodurch das „Rollen“ der Zellen, die feste

Bindung und/oder die Diapedese der Leukozyten gehemmt wird. Zusätzlich kann auch die Expression und/oder die Funktion der Integrine auf den Neutrophilen beeinträchtigt werden. NO übt außerdem auf vielfältige Art und Weise Einfluss auf die Zytokine der weißen Blutkörperchen aus (Bogdan 2001; Förstermann und Sessa 2011). Auch wird eine NF- $\kappa$ B-hemmende Aktivität und die damit verbundene Unterdrückung proinflammatorischer Gene NO zugeschrieben (Colasanti und Persichini 2000). Aber auch zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch NO kann es kommen (Laroux et al. 2001). Neben der Fähigkeit Mikroorganismen abzutöten und Makromoleküle zu nitrosylieren, werden auch zytotoxische Effekte für NO aufgeführt. Neben NO kommt es in Knochenmarkszellen normalerweise auch zur Bildung großer Mengen des Superoxid-Anions ( $O_2^-$ ). Aus NO und  $O_2^-$  kann letztendlich das Peroxynitrit-Anion  $ONOO^-$  gebildet werden, welches zu DNA-Schäden, LDL-Oxidation, Isoprostan-Bildung, Tyrosin-Nitrierung und Hemmung sowohl der Aconitase, als auch der mitochondrialen Atmungskette führen kann (Guzik et al. 2003).

### 3.1.4.5.2 Versuchsdurchführung

#### *Grundlage*

Wird die Zelllinie RAW 264.7 mit LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert, geben die Zellen Stickstoffmonoxid (NO) nach außen ab. Durch Reaktion mit Sauerstoff und Wasser kommt es zur Oxidation der NO-Radikale zu Nitrit-Ionen, die im Medium akkumulieren und mit dem Griess-Reagenz, durch Diazotierung und anschließender Azokupplung, photometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden können (Misko et al. 1993).

Es soll die Fähigkeit der Substanzen zur Reduzierung der Nitrit-Ionen im Überstand getestet werden. Ob dabei die iNOS-Synthese bzw. deren Aktivität vermindert wird oder NO bzw. Nitrit selbst abgefangen wird, lässt sich mit dem Assay nicht abschließend klären.

#### *Versuchsdesign*

##### Aussäen der Zellen

Für den Griess-Assay wurden pro Well einer 96-Well-Platte  $8 \times 10^4$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ L ausgesät. Die außenliegenden Wells wurden abermals zur Vermeidung von Randeffekten mit 100  $\mu$ L PBS befüllt.



Substanzaufgabe und Stimulierung mit LPS

Nach 24 Stunden bei bereits genannten, definierten Bedingungen (**Kapitel 3.1.3.2**, S. 210) wurden die Überstände entfernt und die Verdünnungen der zu testenden Substanzen in farblosem RPMI-Medium, um den photometrischen Nitrit-Nachweis nicht zu stören, in doppelter Konzentration (50 µL) aufgegeben ( $c_{\text{end}} = 10, 7,5, 5, 2,5$  und  $1 \mu\text{M}$ ). Zusätzlich wurden 50 µL LPS-Lösung ( $c_{\text{end}} = 10 \text{ ng/mL}$ ) den zu stimulierenden Wells zugesetzt. Fünf Kontroll-Wells wurden lediglich 50 µL RPMI zugegeben und blieben damit ohne Stimulierung. Als Positivkontrolle fanden verschiedene Konzentrationen an Quercetin Verwendung.

Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Überstand und Auswertung

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden 50 µL aus jedem Well entnommen und in eine neue 96-Well Platte überführt. Diese wurden mit 50 µL frisch hergestelltem Griess-Reagenz versetzt und 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Nach diesem Zeitintervall wurde die Absorption der Wells im TECAN-Reader bei 560 nm ermittelt. Eine Lösung wurde in fünf Wells und in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Zur Kontrolle wurden fünf Wells ohne Stimulus inkubiert (natürliche NO-Produktion) und fünf weitere mit Kulturmedium und LPS-Stimulierung zur Ermittlung der maximalen NO-Freisetzung (NO-Konzentration = 100 %).

**Tabelle 68** Chemikalien und Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen

| Bezeichnung                             | Spezifizierung   | Hersteller                         |
|---|--|------------------------------------|
| <b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>          | Lipopolysaccharid aus <i>E.coli</i> 055.B5   | Sigma-Aldrich,<br>Taufkirchen (DE) |
|   | Stammlösung 1: 200 µg/mL in PBS, gelagert bei 4 °C<br>Stammlösung 2: 2 µg/mL in PBS, gelagert bei 4 °C<br>verwendete Lösung: 20 ng/mL in Kulturmedium,<br>frisch hergestellt |                                    |
| <b>Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)</b> | p.a., EMSURE®  | Merck,<br>Darmstadt (DE)           |
|   | Stammlösung: 1 mM in farblosem RPMI-Medium,<br>einmal wöchentlich frisch hergestellt und daraus die Verdün-<br>nungen 100, 50, 25 und 10 µM angefertigt                      |                                    |

Fortsetzung Tabelle 68

|   |  |                                 |
|---|--|---------------------------------|
| <b>NED</b>  | N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid, ≥98 % | Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE) |
| <b>o-Phosphorsäure</b>  | <i>ortho</i> -Phosphorsäure, p.a., 85 %          | Merck, Darmstadt (DE)           |
| <b>Sulfanilamid</b>   | 99 %   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE) |
| <b>Griess-Reagenz</b>   |  |                                 |
|   | NED  | 50 mg                           |
|   | Sulfanilamid                                     | 500 mg                          |
|   | <i>ortho</i> -Phosphorsäure 85 %                 | 175 µL                          |
| auf 50 mL mit Wasser auffüllen, im Wasserbad lösen und vor Gebrauch abkühlen lassen |  |                                 |
| <b>Quercetin</b>  | Quercetin-dihydrat, >98 %                        | Sigma Aldrich, Taufkirchen (DE) |
|   | Stammlösung: 50 mM in DMSO, gelagert bei -20 °C  |                                 |

Erstellen einer Kalibriergerade

Parallel hierzu wurde eine Kalibriergerade mit NaNO<sub>2</sub>-Lösungen der Konzentrationen 10, 25, 50 und 100 µM erstellt und ebenfalls mit Griess-Reagenz versetzt und vermessen.

MTT-Assay mit RAW 264.7-Zellen

Um die Toxizität der zu testenden Substanzen auf die Zelllinie abschätzen zu können, wurde auch hier ein MTT-Assay durchgeführt. Ausgesät wurden hierfür 5 x 10<sup>3</sup> Zellen pro Well (100 µL). Getestet wurden die Konzentrationen 20, 15, 10, 5 und 1 µM in Pentaplikaten (n = 3). Die Durchführung des Assays erfolgte analog dem MTT-Assay mit HMEC-Zellen (**Kapitel 3.1.4.1**, S. 213).

### **3.1.4.6 Neurotoxizitäts- und Neuroprotektivitäts-Assay**

#### **3.1.4.6.1 Hintergrund**

##### **3.1.4.6.1.1 Freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress**

Freie Radikale zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und einer damit verbundenen außerordentlichen Reaktivität aus (Akhlaq et al. 1987). In physiologischen, aber auch pathologischen Vorgängen entstehen im menschlichen Körper häufig freie Radikale als Zwischenprodukte (Sies 1991). Die gebildeten reaktiven Metabolite können dabei in zwei Gruppen unterteilt werden: auf der einen Seite die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), auf der anderen Seite reaktive Stickstoffverbindungen (RNS). Unter den ROS versteht man das Superoxidradikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroperoxyradikal ( $HO_2^{\cdot}$ ) und das Hydroxyradikal ( $HO^{\cdot}$ ), genauso wie die nicht radikalischen Moleküle Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Singulett Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Ozon ( $O_3$ ) und Hypochlorid ( $OCl^-$ ) sowie die organischen Peroxide, Alkoxyl ( $RO^{\cdot}$ ) und Peroxyl ( $RO_2^{\cdot}$ ). Der Begriff RNS fasst das Stickstoffoxid ( $NO^{\cdot}$ ) und das Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) zusammen (Gilbert und Colton 2002).

Reaktive Sauerstoffspezies führen zur Oxidation und zum Abbau vieler biologischer Makromoleküle, wie Lipiden (vor allem in der Zellmembran), Proteinen und DNA, aber genauso sind sie auch vonnöten für die Signalübertragung und Regulierung in Zellen (Finkel 1998; Gilbert und Colton 2002; Halliwell und Gutteridge 2007).

Normalerweise bilden die oxidierenden reaktiven Sauerstoffspezies und die Antioxidantien im menschlichen Organismus ein ausbalanciertes System. Überwiegen die ROS so werden unsere Zellen oxidativem Stress ausgesetzt. (Gilbert und Colton 2002; Halliwell und Gutteridge 2007)

##### **3.1.4.6.1.2 Glutamat-induzierte Neurotoxizität**

Bei L-Glutaminsäure handelt es sich um eine nicht-essentielle Aminosäure und einen wichtigen Neurotransmitter im menschlichen Organismus (Lüllmann et al. 2006).

Bereits 1957 konnten Lucas und Newhouse (1957) Glutamat-vermittelte toxische Effekte auf die Gliazellen der Retina feststellen. Auch Olney und Ho bestätigten 1970 dieses Phänomen, wurden aber mit ihrer Glutamat-Theorie anfangs nicht ernst genommen. Mittlerweile sind für die Toxizität des Glutamats zwei unterschiedliche Wege bekannt:

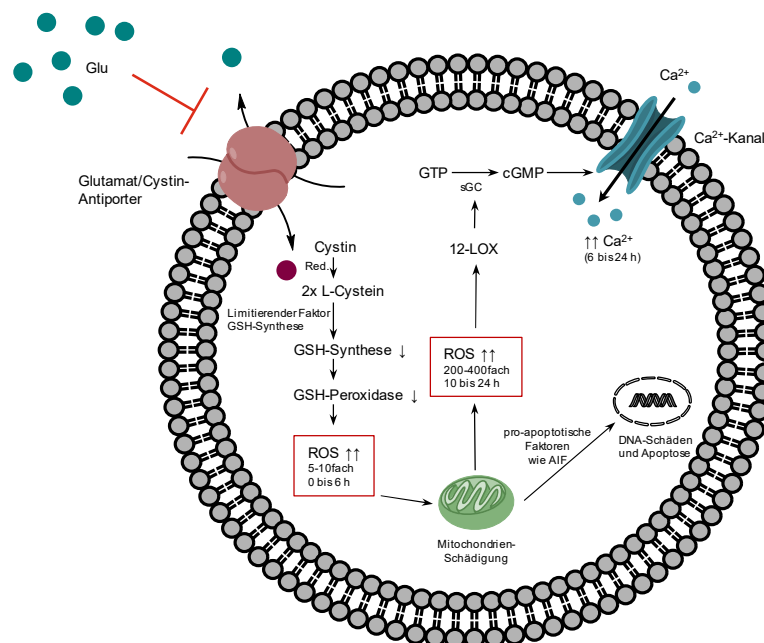
### Exzitotoxizität

Exzitotoxizität wird als „Toxizität auf Neuronenzellen ausgelöst durch übermäßige Aktivierung ionotroper Glutamat-Rezeptoren“ definiert (Winkler et al. 2004; Puyal et al. 2013). Durch den Agonisten Glutamat wird insbesondere der Ionenkanal NMDA aktiviert und die Permeabilität für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle erhöht (Ascher und Nowak 1987; MacDermott und Dale 1987; Mayer und Westbrook 1987; Nicoll et al. 1988). Das Öffnen des Ionenkanals hat zwei Effekte zur Folge. Zunächst kommt es zum akuten Anschwellen der Neuronen. Dieses wird vermutlich durch den  $\text{Na}^+$ -Einstrom, die daraus resultierende Depolarisation der Zellmembran und den nachfolgenden Influx von  $\text{Cl}^-$ -Ionen und Wasser in die Nervenzelle ausgelöst (Choi 1988). Danach folgt verzögert der Zerfall der betroffenen Zellen, welcher durch den Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration initiiert wird. Der zytotoxische Effekt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist vielfältig und soll hier lediglich mit wenigen Beispielen gezeigt werden. Gemäß Leonard und Salpeter (1982) wird die Neutral Protease Calpain aktiviert, welche mit Beeinträchtigungen aufgrund der Induktion cholinergischer Agonisten am Muskel in Verbindung gebracht werden kann. Außerdem kann die Isoform Calpain 1 zum Abbau einiger neuronaler Proteine führen, wie unter anderem Tubulin, Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Neurofilament Polypeptide und Spektrin (Siman und Noszek 1988). Chan und Fishman (1980) zeigen, dass die erhöhte, zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Anregung von Phospholipasen, welche die Zellmembran zerstören und damit Arachidonsäure freisetzen, führt. Durch den Abbau der Arachidonsäure mittels Oxidasen werden freie Sauerstoffradikale gebildet, welche wiederum den peroxidativen Abbau von Lipidmembranen auslösen.

### Oxytose

Der durch Tan et al. (2001) geprägte Begriff „Oxytose“ bezeichnet eine Art des programmierten Zelltods, der durch oxidativen Stress ausgelöst wird. Dieser Glutamat-induzierte Niedergang der Zellen ist nicht rezeptorvermittelt, sondern die Folge der Blockade des Glutamat/Cystin-Antiporers in der Zellmembran (Bridges et al. 2012). Durch das Membranprotein wird ein Glutamat im Austausch gegen ein Cystin aus der Zelle befördert, was allerdings bei hoher extrazellulärer Glutamat-Konzentration unterbunden wird. Dadurch verarmt die Zelle an Cystin, welches intrazellulär zu zwei Molekülen L-Cystein reduziert werden würde und den limitierenden Faktor für die Glutathion-Synthese darstellt. Die Verknappung an Glutathion, welches ein äußerst wichtiges intrazelluläres Antioxidans darstellt (Pompella et al. 2003), führt zunächst zu einem 5 bis 10fachen Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (Tan et al. 1998a), wodurch die Zellen oxidativem Stress

ausgesetzt sind (Murphy et al. 1989; Tan et al. 1998b). Die darauffolgende explosionsartige Vervielfachung der ROS auf das 200 bis 400fache der normalen Menge ist nicht mehr nur auf den Mangel an Glutathion zurückzuführen, sondern vielmehr dem Niedergang der Mitochondrien zuzuschreiben (Tan et al. 1998a). Durch die stark erhöhte Konzentration an ROS kommt es zur Aktivierung der 12-Lipoxygenase (12-LOX), deren Produkte wiederum die Umwandlung von GTP zu cGMP durch die lösliche Guanylylcyclase (sGC) fördern (Tan et al. 2001). cGMP bewirkt die Öffnung von cGMP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, durch die extrazelluläres Calcium in die Zellen eindringen kann und dessen Akkumulierung für die finale Lyse der Zellen verantwortlich ist (Tan et al. 1998a; Fukui et al. 2009).



**Abbildung 144** Glutamat-vermittelte Toxizität auf HT-22-Zellen in Anlehnung an Tan et al. (1998a)

**Glu** Glutamat, **GSH** Glutathion, **ROS** reaktive Sauerstoffspezies, **GTP** Guanosintriphosphat, **sGC** zytosolische Guanylatcyclase, **cGMP** cyclisches Guanosinmonophosphat, **12-LOX** 12-Lipoxygenase, **AIF** Apoptose-auslösender Faktor

### 3.1.4.6.2 Versuchsdurchführung

#### Grundlage

Mit dem Neurotoxizitäts- bzw. Neuroprotektivitäts-Assay soll die Viabilität von neuronalen Zellen unter Einfluss verschiedener Substanzen bzw. Behandlung mit Glutamat untersucht werden. Die Basis bildet der bereits erläuterte MTT-Assay. Im Neurotoxizitäts-Assay wird auf die Eigentoxizität

der Substanzen in den verwendeten Konzentrationen getestet. Im Neuroprotektions-Assay wird die Aufhebung des toxischen Effektes von Glutamat auf Zellen untersucht.

### *Versuchsdesign*

#### Aussäen der Zellen

Es wurde eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen/mL hergestellt und je 100  $\mu\text{L}$  hiervon ( $5 \times 10^3$  Zellen) in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Zur Vermeidung von Randeffekten wurden in die außenliegenden Wells 100  $\mu\text{L}$  PBS gefüllt.

#### Substanzaufgabe

Nach 24stündiger Wachstumsphase ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden die Überstände abgesaugt und durch die gewünschten Konzentrationen der Testsubstanzen ersetzt. Parallel wurden zwei Testungen durchgeführt. Um die Eigentoxizität der Verbindungen auf die neuronale Zelllinie zu bestimmen, wurde das Medium abgesaugt und durch 100  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Verdünnungen der Testsubstanzen ersetzt. Getestet wurden die Konzentrationen 25, 10, 5 und 1  $\mu\text{M}$ . Für die Ermittlung des neuroprotektiven Potentials der Substanzen wurden je Well 50  $\mu\text{L}$  der Testlösung (in doppelter Endkonzentration) und 50  $\mu\text{L}$  der Glutamatlösung ( $c_{\text{end}} = 5 \text{ mM}$ ) gegeben. Als Positivkontrolle diente Quercetin ( $c_{\text{end}} = 25 \mu\text{M}$ ), als Negativkontrolle die alleinige Stimulierung mit Glutamat. Sechs Wells blieben ohne Stimulus und bildeten den 100 % Wert. Eine Lösungsmittelkontrolle wurde ebenfalls durchgeführt.

**Tabelle 69** Chemikalien und Herstellungsanweisung der entsprechenden Lösungen

| Bezeichnung     | Spezifizierung   | Hersteller               |
|-----------------|--|--------------------------|
| <b>Glutamat</b> | Mononatrium-L-Glutamat,<br>$\geq 99 \%$  | Merck,<br>Darmstadt (DE) |
|                 | Stammlösung: 1 M in PBS, gelagert bei $-20^\circ\text{C}$<br>verwendete Lösung: 10 mM in Kulturmedium, frisch hergestellt<br>(entspricht der doppelten Endkonzentration) |                          |

Fortsetzung Tabelle 69

|                  |  |                                    |
|------------------|--|------------------------------------|
| <b>Quercetin</b> | Quercetin-dihydrat, >98 %  | Sigma Aldrich,<br>Taufkirchen (DE) |
|                  | Stammlösung: 0,1 M in DMSO, gelagert bei -20 °C<br>verwendete Lösung: 50 µM in Kulturmedium, frisch hergestellt<br>(entspricht der doppelten Endkonzentration) |                                    |

Aufarbeitung und Auswertung der Platten

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Assay gemäß **Kapitel 3.1.4.1**, S. 213 bestimmt.

**3.1.4.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse des MTT-, ICAM-, Griess- und Neurotoxizitäts- bzw. Neuroprotektivitäts-Assay wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Dabei beziehen sich die Werte, mit Ausnahme derer des ICAM-1-Assays, auf die Mittelwerte der unbehandelten Zellen, die als 100 % gesetzt wurden. Die Ergebnisse des ICAM-Assays wurden auf die maximale ICAM-1-Expression, die als 100 % bestimmt wurde, bezogen. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten (ICAM-1-Assay), Pentaplikaten (Griess-Assay) oder Hexaplikaten (MTT und Neurotoxizitäts- bzw. Neuroprotektivitäts-Assay) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5.03, indem die Daten einer einfachen ANOVA gefolgt von einem Dunnetts Posttest unterzogen wurden. Die Signifikanzlevel wurden als signifikant \* $p < 0,05$ , sehr signifikant \*\* $p < 0,01$  und hochsignifikant \*\*\* $p < 0,001$  angegeben.

Auch für den Proliferations-Assay wurden die Werte auf die Mittelwerte der unbehandelten Zellen, die als 100 % gesetzt wurden, bezogen. Es wurden wenigstens drei voneinander unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt. Die  $IC_{50}$ -Werte ergaben sich durch die Auswertung der Daten mit der Software GraphPad Prism 5.03 mittels der Funktion „nonlinear regression (curve fit), log(inhibitor) vs. normalized response – Variable slope“. Anschließend wurden die drei sich ergebenden Werte per Microsoft® Excel gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

### 3.2 Auswertung und Diskussion der zellbiologischen Ergebnisse

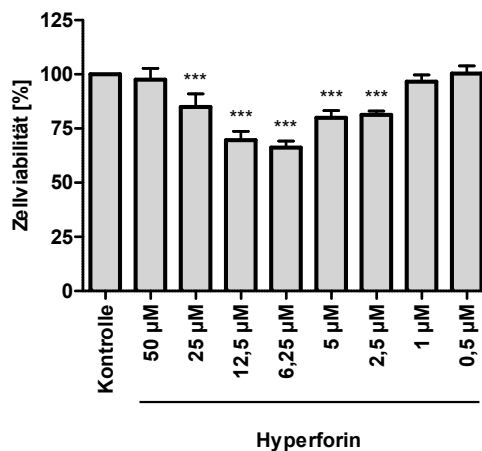
Im Folgenden sollen die Ergebnisse der getesteten Substanzen in den verschiedenen Testsystemen dargestellt werden. Einsatz fanden hierbei die vier Acylphloroglucinole vom A-Typ **1** bis **4**, die vier Adamantanderivate **5**, **6**, **8** und **9** und neun Vertreter der größten Gruppe, den Homoadamantan-Derivaten **10** bis **14**, **16**, und **21** bis **23**. Verglichen wurden die Ergebnisse mit dem wohl bekanntesten Vertreter der Acylphloroglucinole, dem **Hyperforin**, welches käuflich erworben wurde. Abschließend werden die Ergebnisse diskutiert und mit Daten aus der Literatur verglichen.

#### 3.2.1 Ermittlung der Zellviabilitäten von HMEC-1-Zellen

Um den Konzentrationsbereich für die nachfolgenden Testungen an HMEC-1-Zellen festzulegen, wurde zunächst für alle Substanzen ein MTT-Assay durchgeführt, der den Einfluss der zu testenden Verbindungen auf die Viabilität der Zellen widerspiegelt. Die Substanzen sollten bestenfalls in der höchsten Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) keine oder nur geringe toxische Effekte auf die Zellen ausüben, wobei Viabilitäten >90 % als akzeptabel und noch nicht als zytotoxisch angesehen wurden. Ermittelt wurden die Ergebnisse bezogen auf eine Kontrollgruppe (100 %), die unbehandelt blieb. Auch der Einfluss des Lösungsmittels DMSO in der höchsten verwendeten Konzentration (0,1 %) wurde ermittelt, zeigte jedoch keine Veränderung der Viabilität.

Der Effekt des **Hyperforins** auf die Viabilität der HMEC-1-Zellen ist sehr interessant. Die Verbindung zeigt keine klassische, konzentrationsabhängige Toxizität auf die Zelllinie, sondern wirkt bei steigender Verdünnung zunehmend toxischer. So ist in der höchsten Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe auszumachen, 25  $\mu\text{M}$  führen schon zu einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Aktivität auf  $84,9 \pm 6,1$  % und die höchste Aktivität wird mit  $66,2 \pm 3,0$  % bei 6,25  $\mu\text{M}$  erreicht (**Abbildung 145**). In **Abbildung 145** wird außerdem ersichtlich, dass bei noch geringeren Konzentrationen wieder ein Anstieg der Zellviabilität auf  $80,0 \pm 3,3$  bzw.  $81,3 \pm 1,7$  % bei 5 bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen ist und ab einer Verdünnung von 1  $\mu\text{M}$  keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mehr vorhanden sind.

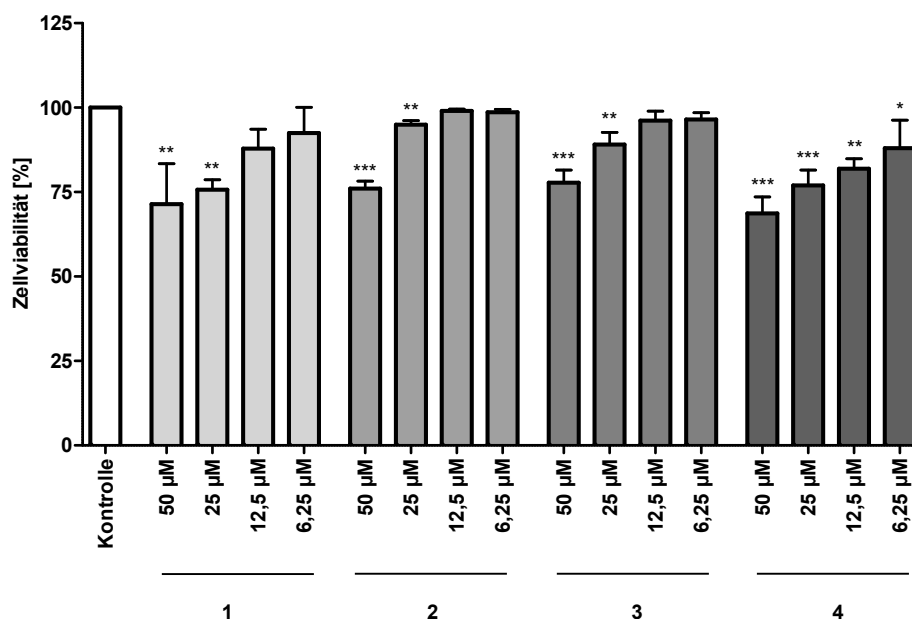




**Abbildung 145** Viabilitäten der HMEC-1-Zellen in Abhängigkeit der Hyperforinkonzentrationen von 50, 25, 12,5, 6,25, 5, 2,5, 1 und 0,5; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW  $\pm$  StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*\*\*p < 0,001)

Wodurch dieser Verlauf ausgelöst wird, kann nur vermutet werden. Möglicherweise wird im Überlebenskampf der Zellen die Aktivität der Mitochondrien so stark gesteigert, sodass trotz der Reduktion der Zellzahl die Menge an gebildeten Formazan konstant bleibt. Obwohl für **Hyperforin** in den Konzentrationen 5 und 2,5 µM leichte toxische Einflüsse auf die Zelllinie ermittelt wurden, fanden in den folgenden *in-vitro* Testsystemen die Verdünnungen 5, 2,5, 1 und 0,5 µM Verwendung.

Für Substanzen **1** bis **4**, die dem Hyperforin am nächsten verwandt sind, ist der oben beschriebene ungewöhnliche Verlauf der Zell-Viabilität nicht zu beobachten. In allen Fällen weist die höchste Konzentration eine signifikante Reduktion der Viabilität unter 90 % auf ( $71,4 \pm 12,0$  % für **1**,  $76,0 \pm 2,2$  % für **2**,  $77,8 \pm 3,8$  % für **3** und  $68,7 \pm 4,8$  % für **4**) (**Abbildung 146**). Für **2** und **3** steigt die Viabilität bereits bei 25 µM wieder über 90 % ( $94,9 \pm 1,2$  % für **2** und  $89,1 \pm 3,6$  % für **3**), wohingegen für **1** und **4** der Wert für die Viabilität darunter bleibt ( $75,7 \pm 2,9$  % für **1** und  $76,9 \pm 4,6$  % für **3**). Auch die stärksten Verdünnungen weisen noch leicht toxische Effekte auf, die allerdings für **1** nicht mehr signifikant sind.

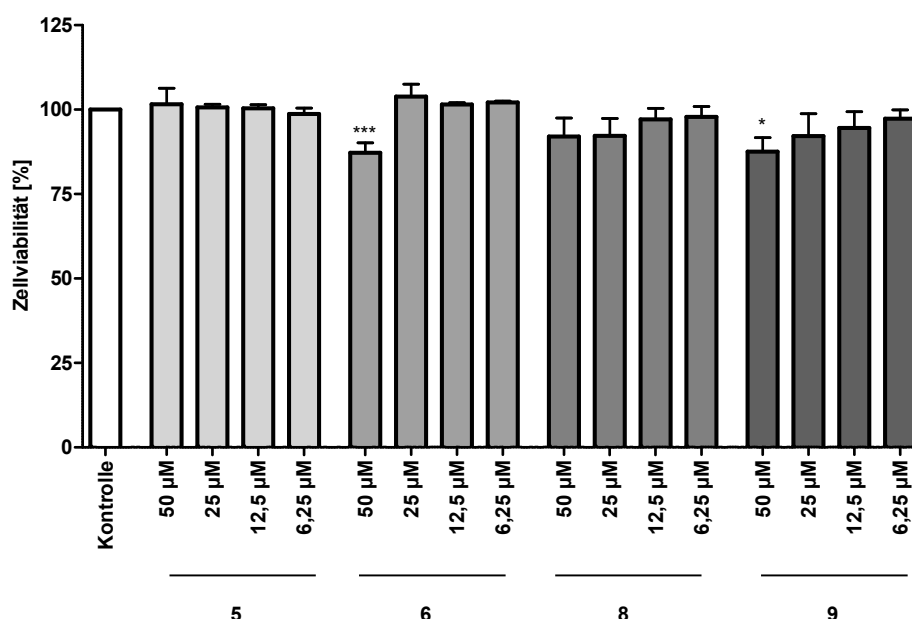


**Abbildung 146** Viabilitäten der HMEC-1-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von 50, 25, 12,5 und 6,25 µM der Substanzen **1** bis **4**; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001)

Aufgrund der Toxizität, vor allem bei hohen Konzentrationen, wurden diese für den Proliferations-Assay auf 20, 10, 5 und 1 µM herabgesetzt.

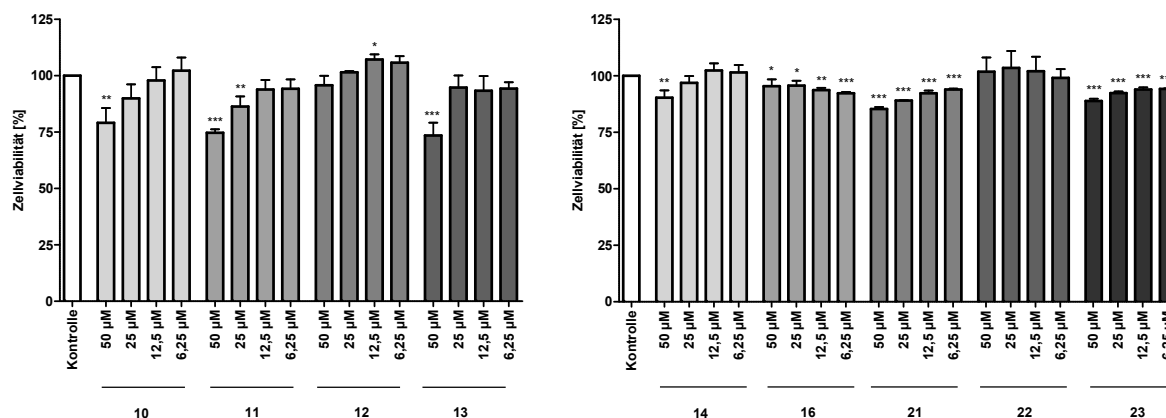
Die Adamantanderivate **5**, **6**, **8** und **9** zeigen in alle getesteten Konzentrationen kaum Einfluss auf die Viabilität der HMEC-1-Zellen. Lediglich **6** und **9** verringern bei 50 µM die Bildung der Formazans signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe auf  $87,2 \pm 3,0 \%$  (**6**) und  $87,6 \pm 4,1 \%$  (**9**) und zeigen damit geringfügig toxische Effekte (**Abbildung 147**).

Da es sich bei **6** und **9** um die 2-Methylbutyryl-Analoga von **5** und **8** handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die erhöhte Toxizität dieser beiden Verbindungen durch die leichte Erhöhung der Lipophilie zu erklären ist.



**Abbildung 147** Viabilitäten der HMEC-1-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von 50, 25, 12,5 und 6,25 µM der Substanzen **5**, **6**, **8** und **9**; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001)

In **Abbildung 148** wird der Einfluss einiger Acylphloroglucinole (**10** bis **14**, **16**, **21** bis **23**) vom Homoadamantan-Typ auf die Viabilität der HMEC-1-Zellen gezeigt. Eine Verringerung der Reduktase-Aktivität ist vor allem für **11** und **13** in der höchsten Konzentration (50 µM) zu verzeichnen. Die Viabilität liegt hier bei  $74,7 \pm 1,6$  % für **11** und  $73,5 \pm 5,7$  % für **13**. Zurückzuführen ist dieser negative Einfluss möglicherweise auf die Peroxid-Funktion, die in beiden Verbindungen vorhanden ist. Auch bei den anderen Substanzen kommt es zum Teil zu signifikanten Differenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dennoch ist eine Zellviabilität von über 90 % in den meisten Fällen gegeben und somit weist diese Gruppe an Acylphloroglucinolen keine oder nur geringfügige toxische Effekte auf die Zelllinie auf.



**Abbildung 148** Viabilitäten der HMEC-1-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen von 50, 25, 12,5 und 6,25 µM der Substanzen **10** bis **14**, **16** und **21** bis **23**; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass von den hier getesteten Substanzen das **Hyperforin** und seine Analoga in dem gewählten *in-vitro* Testsystem einen wesentlich höheren toxischen Effekt auf die HMEC-1-Zellen ausüben, als die komplexen, trizyklischen Derivate vom Adamantan- und Homoadamantan-Typ.

### 3.2.2 Einfluss ausgewählter Substanzen auf unterschiedliche Punkte in der Kaskade der Angiogenese

#### 3.2.2.1 Proliferationshemmung

Alle in **Kapitel 3.2.1**, S. 238 aufgeführten Verbindungen wurden im Proliferations-Assay getestet. Wünschenswert ist eine deutliche Hemmung der Proliferation der HMEC-1-Zellen bei geringer Konzentration der getesteten Substanzen. Für fast alle Substanzen (außer den Adamantan-Derivaten **5**, **6**, **8** und **9** sowie **12** und **14**) mussten zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte die Testkonzentrationen auf 20, 10, 5 und 1 µM herabgesetzt werden, da die ursprünglich verwendeten Verdünnungen (50, 25, 12,5 und 6,25 µM) auf die stark verminderte Zellzahl von nur 1,5 x 10<sup>3</sup> Zellen/Well toxischer wirkten, als es im MTT-Assay (9 x 10<sup>4</sup> Zellen/Well) ermittelt wurde. Zytotoxische Effekte kommen bei einzelnen Zellen meist stärker zu Tragen als bei einem konfluent bewachsenen Zellrasen.

Auch in diesem Assay sticht das Acylphloroglucinol **Hyperforin** deutlich hervor. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $0,8 \pm 0,2 \mu M$  zeigt es unter den Testsubstanzen die stärkste Reduktion der Proliferation (**Tabelle 70**). Die Aktivitäten der am nächsten verwandten Derivate **1** bis **4** sind mit  $IC_{50}$ -Werten von 10 bis  $13 \mu M$  um den Faktor 10 herabgesetzt. Eine dem Hyperforin vergleichbare Aktivität konnte für die beiden Homoadamantan-Abkömmlinge **11** ( $2,7 \pm 1,1 \mu M$ ) und **13** ( $4,0 \pm 2,9 \mu M$ ) ermittelt werden. Beide Verbindungen enthalten eine Peroxid-Funktion auf die die Aktivität möglicherweise zurückzuführen ist.

Die  $IC_{50}$ -Werte der restlichen Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ liegen im Bereich von 9 bis  $13 \mu M$  sehr nah beieinander und ähneln denen der Substanzen **1** bis **4**. Lediglich Verbindung **14** weist mit einem  $IC_{50}$ -Wert von etwa  $20 \mu M$  eine schwächere proliferationshemmende Aktivität auf. Auf welches Strukturelement das verminderte Potential zurückzuführen ist, ist schwer zu beurteilen, doch scheint es nicht am zusätzlichen Tetrahydrofuranring zu liegen, der auch in der Struktur von **16** zu finden ist.

Aus **Tabelle 70** geht außerdem hervor, dass die Acylphloroglucinole mit Adamantan-Grundgerüst im Vergleich mit den anderen isolierten Verbindungen leicht an Aktivität einbüßen und ihre  $IC_{50}$ -Werte um  $16 \mu M$  liegen.

Ein Einfluss der Startersäure auf die antiproliferative Aktivität auf HMEC-1-Zellen lässt sich anhand der hier ermittelten Daten nicht ausmachen, dennoch scheinen die Derivate mit einer Isobutyryl-Einheit tendenziell potenter zu sein. Konträres Verhalten hinsichtlich der Auswirkung der unterschiedlichen Acylreste beschreibt Schmidt (2013). In seiner Arbeit weisen die 2-Methylbutyryl-Derivate im Vergleich mit den entsprechenden Verbindungen mit einem Isobutyrylrest ein zum Teil deutlich erhöhtes Potential bei der Hemmung der Proliferation von HMEC-1-Zellen auf.

**Tabelle 70** Antiproliferative Aktivität der **isolierten Verbindungen** und des **Hyperforins** auf HMEC-1-Zellen

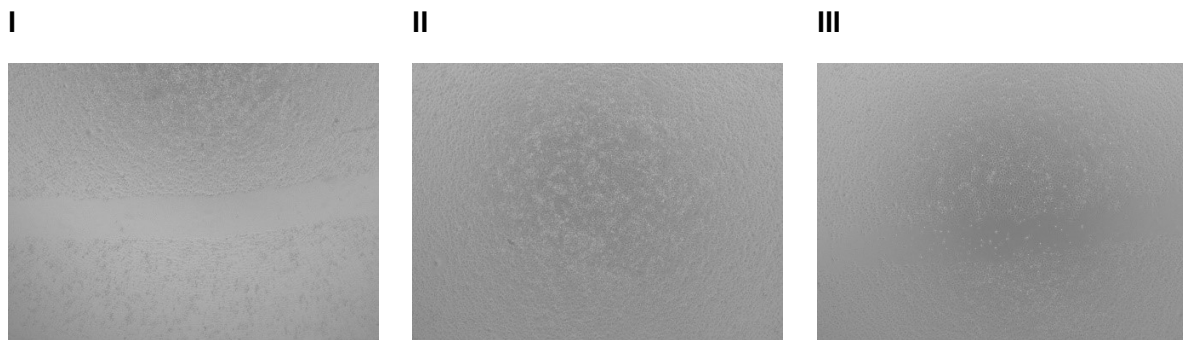
Daten sind als MW  $\pm$  StabW dargestellt, die IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit GraphPadPrism® mittels der Funktion „Nonlinear regression (curve fit); log(inhibitor) vs. normalized response – Variable slope“ berechnet; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt und daraus der Mittelwert samt Standardabweichung mit Microsoft® Excel ermittelt

|                             |  | Substanz            | IC <sub>50</sub> [μM] | Substanz                 | IC <sub>50</sub> [μM] |
|-----------------------------|--|---------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
|                             |  | Isobutyryl-Derivate |                       | 2-Methylbutyryl-Derivate |                       |
| Typ-A<br>Acylphloroglucinol |  | <b>Hyperforin</b>   | 0,8 $\pm$ 0,2         |                          |                       |
|                             |  | <b>2</b>            | 9,5 $\pm$ 1,5         | <b>1</b>                 | 10,0 $\pm$ 3,6        |
|                             |  |                     |                       | <b>3</b>                 | 12,3 $\pm$ 0,9        |
|                             |  |                     |                       | <b>4</b>                 | 13,4 $\pm$ 7,9        |
| Ada-<br>mantan              |  | <b>5</b>            | 21,4 $\pm$ 8,0        | <b>6</b>                 | 16,2 $\pm$ 7,2        |
|                             |  | <b>8</b>            | 15,1 $\pm$ 5,6        | <b>9</b>                 | 15,5 $\pm$ 10,0       |
| Homo-<br>adamantan          |  | <b>10</b>           | 8,2 $\pm$ 3,0         | <b>12</b>                | 12,4 $\pm$ 3,4        |
|                             |  | <b>11</b>           | 2,7 $\pm$ 1,1         | <b>13</b>                | 4,0 $\pm$ 2,9         |
|                             |  |                     |                       | <b>14</b>                | 20,1 $\pm$ 3,1        |
|                             |  |                     |                       | <b>16</b>                | 12,9 $\pm$ 5,6        |
|                             |  |                     |                       | <b>21</b>                | 9,5 $\pm$ 3,4         |
|                             |  | <b>22</b>           | 8,1 $\pm$ 1,4         | <b>23</b>                | 9,2 $\pm$ 2,8         |

### 3.2.2.2 Migrationshemmung

Substanzen, die in ausreichender Menge zur Verfügung standen (**1**, **3**, **10**, **11**, **13**, **14**, **16** und **Hyperforin**), wurden einem weiteren *in-vitro* Test zur Untersuchung ihrer potentiellen anti-angiogenetischen Eigenschaft unterzogen. Hierbei stand die Fähigkeit der Zellen zur Migration in einen zellfreien Spalt im Fokus.

Für keine der Substanzen konnte nach 19 Stunden Inkubation ein Effekt auf die Migration festgestellt werden. So zeigte sich bei allen untersuchten Konzentrationen (50, 25, 12,5 und 6,25  $\mu\text{M}$  für **14** und 20, 10, 5 und 1  $\mu\text{M}$  für **1**, **3**, **10**, **11**, **13** und **16** sowie 5, 2,5, 1 und 0,5  $\mu\text{M}$  für **Hyperforin**) vergleichbar mit der Negativkontrolle, der Inkubation mit ECGM, keine zellfreie Fläche mehr im konfluent bewachsenen Zellrasen (**Abbildung 149, II**).



**Abbildung 149 Migrations-Assay mit HMEC-1-Zellen;** Aufnahmen direkt nach der Verwundung (**I**), Aufnahmen nach 19stündiger Inkubation für ECGM (Negativkontrolle) (**II**) und M199 (Positivkontrolle) (**III**) (4fache Vergrößerung)

**I (Abbildung 149)** zeigt den scharf abgetrennten zellfreien Spalt direkt nach der Verwundung. In **III**, der Positivkontrolle, stellt sich die Verwundung des Zellrasens weiterhin als deutlicher „Cut“, allerdings mit weniger scharf begrenzten Rändern dar.

Möglicherweise vermögen die hier isolierten und getesteten Substanzen die Migration der Endothelzellen lediglich für eine gewisse Zeit zu unterbinden oder verlangsamen nur die Wanderung der Zellen in die freie Fläche. Zur Evaluierung dieser Möglichkeiten müsste man den freien Spalt nach verschiedenen Zeitintervallen (zum Beispiel 1, 3, 6, 9 und 16 h) im Vergleich zur Negativkontrolle betrachten.

### 3.2.2.3 Zusammenfassung und Literaturdaten

Für die getesteten Verbindungen ergab sich im Proliferationsassay eine sehr gute bis moderate Aktivität. Während die Vermehrung der Zellen im zum Teil niedrigen einstelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich halbiert werden konnte, zeigte sich keine Hemmung der Migration der Endothelzellen.

In den Arbeiten von Schmidt et al. (2012b) und Schmidt (2013) führen dagegen die beiden im Proliferationsassay aktivsten monozyklische Acylphloroglucinol Derivate mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von 6,5 bzw. 8,2  $\mu\text{M}$ , auch zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der Migration.

**Hyperatomarin**, ein aus *H. annulatum* isoliertes Acylphloroglucinol, zeigt eine Hemmung der Proliferation an humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC, human umbilical vein endothelial cell) (Biljali et al. 2012). Eine Unterdrückung sowohl der Proliferation (signifikant für 10  $\mu\text{M}$  gezeigt), als auch der Tube-Bildung ( $\text{IC}_{50} \sim 15 \mu\text{M}$ ) von humanen endothelialen Vorläuferzellen (EPCs, endothelial progenitor cells) wurde für die Acylphloroglucinole vom A- bzw. B1-Typ, **Garcimultifloron A, B und K**, beobachtet (Cheng et al. 2018a).

Für **Hyperforin** finden sich in der Literatur zahlreiche Indizien hinsichtlich der antiangiogenen Aktivität. So konnte an humanen, dermalen Fibroblasten (HDF) gezeigt werden, dass die Testlösungen sowohl Proliferation ( $\text{IC}_{50} \sim 5 \mu\text{M}$ ), als auch Migration der Zellen (für 10  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden gezeigt) vermindern (Füller und Müller-Goymann 2018). Auch an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) zeigte es sich aktiv (Schempp et al. 2005). Die Arbeitsgruppe von Martínez-Poveda et al. (2005) wies ebenfalls für **Hyperforin** an bovinen Endothelzellen der Aorta (BAEC) neben der Proliferations- ( $\text{IC}_{50} 7 \pm 3 \mu\text{M}$ ) und Migrationshemmung eine Unterdrückung der Tube-Bildung im Matrigel (ab 2,5  $\mu\text{M}$ ) nach. Die Inhibierung der Migration wurde lediglich für eine 10  $\mu\text{M}$  Lösung gezeigt und der Effekt ist nur nach vier, sieben und neun Stunden ersichtlich. Nach 24stündiger Inkubation ist die Wunde wieder gänzlich verschlossen. Fünf Jahre später wurden vergleichbare Ergebnisse auch für das stabile DCHA-Salz von **Hyperforin** ( $\text{IC}_{50} 2,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) und verschiedene Hyperforin-Derivate erhalten (Martínez-Poveda et al. 2010). An verschiedenen endothelialen Zelllinien wurde von Rothley et al. (2009) neben dem **Hyperforin** auch das **Aristoforin** positiv getestet.

Ein Überblick über phenolische Verbindungen mit antiangiogenetischer Aktivität und deren Angriffspunkte in der komplexen Kaskade der Angiogenese wird im Review von Sun et al. (2015) gegeben.



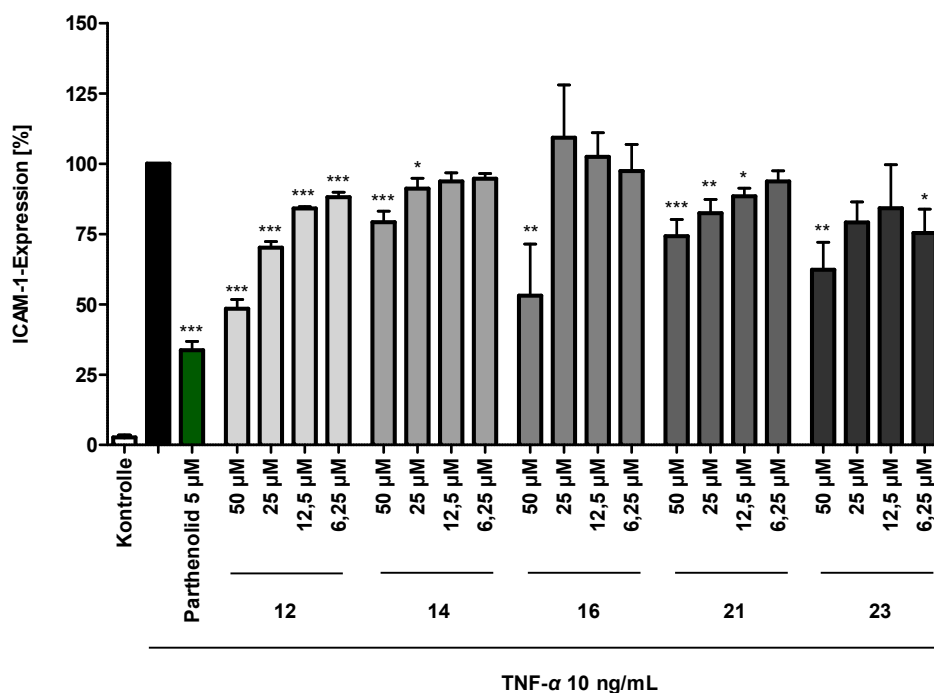
### 3.2.3 Effekte auf unterschiedliche Angriffspunkte im komplexen Entzündungsprozess

#### 3.2.3.1 Hemmung der ICAM-1 Expression bei HMEC-1-Zellen

Fünf Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ (**12**, **14**, **16**, **21** und **23**) wurden in vier Konzentrationen (50, 25, 12,5 und 6,25  $\mu\text{M}$ ) im ICAM-1-Assay getestet. Es wurden nur Verbindungen mit einer 2-Methylbutyryl-Seitenkette gewählt um etwaige Einflüsse des Acylrests auf die Aktivität ausschließen zu können. Die natürliche ICAM-1 Expression der HMEC-1-Zellen wurde in der Kontrollgruppe bestimmt und lag bei etwa 3 % (Basiswert). Das Sesquiterpenlacton **Parthenolid** vermag in der Konzentration 5  $\mu\text{M}$  die totale Expression des Oberflächenmoleküls um rund zwei Drittel auf 33 % zu verringern.

In **Abbildung 150** ist zu sehen, dass die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1 Expression von allen untersuchten Substanzen konzentrationsabhängig verringert wird. Besonders effektiv sind hierbei **12** und **23**. Bereits eine 6,25  $\mu\text{M}$  Lösung reduziert signifikant die Expression auf  $88,1 \pm 1,7$  % (**12**) bzw. auf  $75,3 \pm 8,5$  % (**23**). Durch die höchste Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  kann eine Reduktion auf  $48,5 \pm 3,2$  % (**12**) und  $62,3 \pm 9,8$  % (**23**) erreicht werden.

Auch **16** scheint mit einer Reduktion der Expression des Oberflächenmoleküls um ~50 % (bei 50  $\mu\text{M}$ ) vergleichbar potent zu sein, allerdings ist dieser deutliche Rückgang wohl eher auf toxische Effekte zurückzuführen. Dafür spricht zum einen der vollständige Rückgang der Aktivität für die darauffolgende Verdünnung (25  $\mu\text{M}$ ), zum anderen die große Streuung des Wertes.



**Abbildung 150** Einfluss verschiedener Konzentrationen (50, 25, 12,5 und 6,25 µM) von **12**, **14**, **16**, **21** und **23** auf die TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) induzierte ICAM-1-Expression; die Kontrollgruppe (unbehandelte, nicht mit TNF- $\alpha$  stimulierte Zellen) diente als Basiswert, das Parthenolid (5 µM) entsprach der Positivkontrolle und die ICAM-1-Expression nur mit TNF- $\alpha$  behandelter Zellen wurde als 100 % gesetzt; es wurden drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten sind als MW  $\pm$  StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

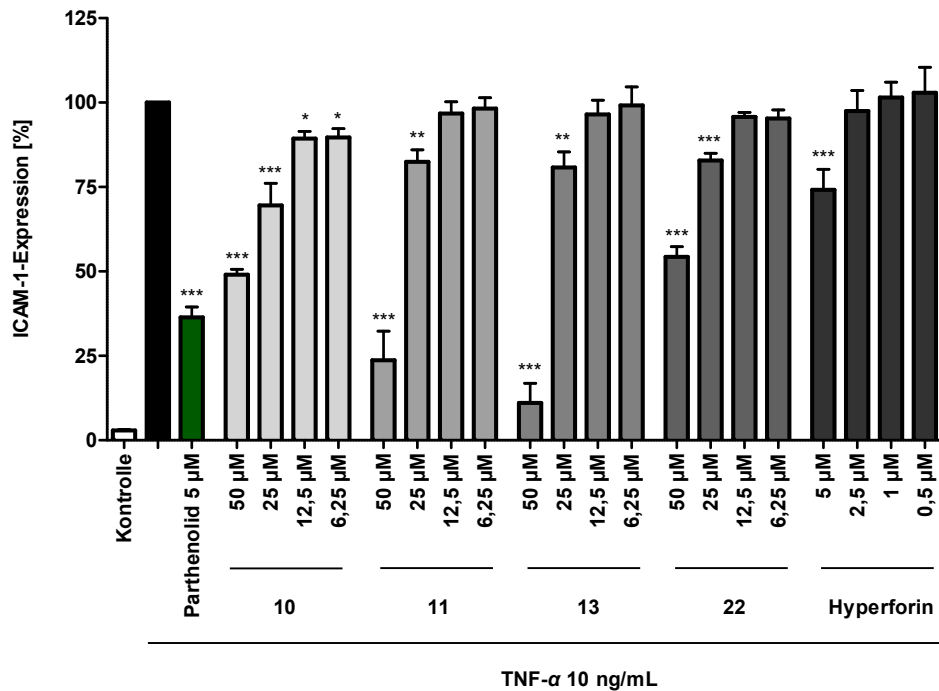
Basierend auf den Ergebnissen der ersten fünf Verbindungen wurden vier weitere zur Testung ihrer Aktivität auf die Reduktion der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression herangezogen. Verwendung fanden Strukturen, die sich von den beiden aktivsten Verbindungen **12** und **23** ableiten: **10**, das Isobutyryl-Derivat von **12** sowie deren beiden Abkömmlinge **11** und **13** und außerdem **22**, das Isobutyryl-Derivat von **23**. Zum Vergleich wurde auch **Hyperforin** getestet, allerdings aufgrund der bereits beschriebenen Toxizität auf HMEC-1-Zellen in den herabgesetzten Konzentrationen 5, 2,5, 1 und 0,5 µM.

Wie das 2-Methylbutyryl-Analogon, verringert auch Substanz **10** in der 50 µM Lösung die Expression des Oberflächenmoleküls um die Hälfte und auch in der höchsten Verdünnung (6,25 µM) kann mit einem Wert von  $89,7 \pm 2,6$  % noch eine leichte, aber signifikante Inhibierung festgestellt werden, die vergleichbar mit der von **12** ist (**Abbildung 151**).

Die beiden mit einer Peroxidgruppe versehenen Derivate **11** und **13** wiesen in der höchsten Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) gravierende toxische Effekte auf, wodurch es zu einer stark verminderten ICAM-1-Expression der HMEC-1-Zellen kam und zusätzlich nur äußerst wenig Zellen detektiert werden konnten. Somit sind die Werte von  $23,7 \pm 8,6 \%$  (**11**) und  $11,1 \pm 5,8 \%$  (**13**) toxizitätsbedingt. Für die nächste Testlösung (25  $\mu\text{M}$ ) konnte nur noch eine mäßige Aktivität ( $82,5 \pm 3,5$  für **11** und  $80,8 \pm 4,6 \%$  für **13**) ausgemacht werden.

Aus **Abbildung 151** geht hervor, dass die Aktivität zur Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression durch **22** für die ersten beiden Verdünnungen,  $54,3 \pm 3,0 \%$  (50  $\mu\text{M}$ ) und  $82,8 \pm 2,2 \%$  (25  $\mu\text{M}$ ), sehr ähnlich der des nah verwandten Acylphloroglucinols **23** ist. Bei 12,5 und 6,25  $\mu\text{M}$  weist **22** im Gegensatz zu **23** allerdings kein ICAM-1 hemmendes Potential mehr auf.

Die 5  $\mu\text{M}$  Lösung von **Hyperforin** vermag die ICAM-1 Konzentration um  $\sim 25 \%$  auf  $74,2 \pm 6,1 \%$  zu verringern, allerdings konnte bei dieser Konzentration auch schon eine Reduktion der Zellviabilität festgestellt werden. Für alle verdünnteren Untersuchungslösungen war keine Inhibierung der ICAM-1-Expression mehr zu beobachten.



**Abbildung 151** Einfluss verschiedener Konzentrationen (50, 25, 12,5 und 6,25 µM) von **10** bis **12** und **22** sowie des **Hyperforins** in den Konzentrationen 5, 2,5, 1 und 0,5 µM auf die TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) induzierte ICAM-1-Expression; die Kontrollgruppe (unbehandelte, nicht mit TNF- $\alpha$  stimulierte Zellen) diente als Basiswert, das Parthenolid (5 µM) entsprach der Positivkontrolle und die ICAM-1-Expression nur mit TNF- $\alpha$  behandelter Zellen wurde als 100 % gesetzt; es wurden drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten sind als MW  $\pm$  StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

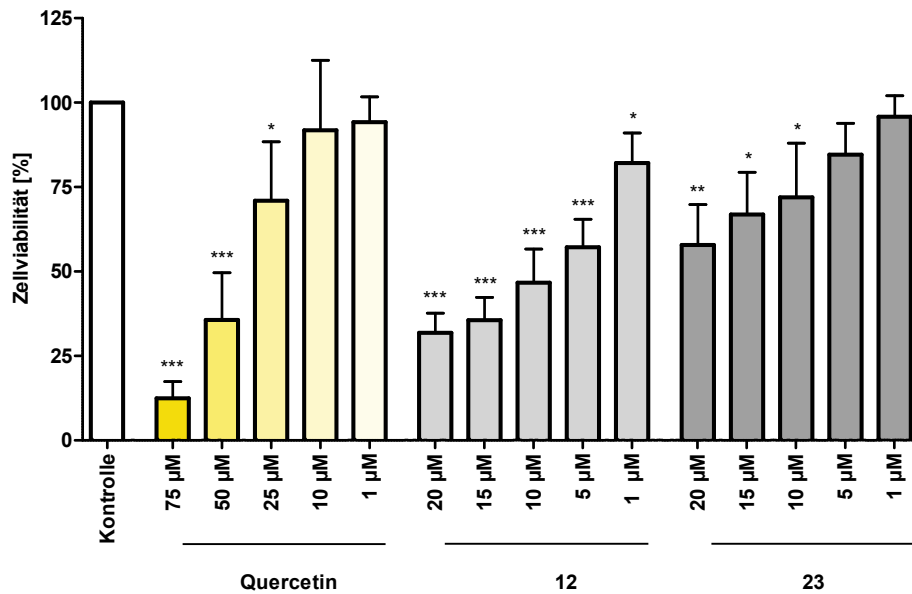
Abschließend lässt sich sagen, dass es durch alle der hier getesteten Acylphloroglucinole zu einer signifikanten Hemmung der TNF- $\alpha$  induzierten ICAM-1-Expression kam. Diese basiert für **11**, **13** und **16** allerdings vermutlich auf zytotoxischen Effekten in den verwendeten Konzentrationen, die zumindest für **11** und **13** auf die Peroxidgruppe zurückzuführen sein könnten. Das hier gewählte *in-vitro* Testsystem scheint außerdem für **Hyperforin** ungeeignet, da die einzige Konzentration, die Auswirkungen zeigt, bereits zu Beeinträchtigung der Vitalität der HMEC-1-Zellen führt. **10**, **12**, **22** und **23** vermögen eine beträchtliche Reduktion der Expression von ICAM-1 auf 50 bis 60 %, die fast an die des Parthenolids heranreicht, jedoch ist dafür eine zehnfach höhere Konzentration (50 µM) vonnöten. Auch die 25 µM Untersuchungslösungen der vier Substanzen zeigen eine signifikante Reduktion des Oberflächenmoleküls. Mit Werten um 75 % ist diese weniger radikal, aber dennoch beachtlich.

### 3.2.3.2 Hemmung der NO-Produktion bei RAW 264.7-Zellen

Die beiden Substanzen mit der höchsten antiinflammatorischen Aktivität im ICAM-1-Assay (**12** und **23**) wurden im Griess-Assay einer weiteren Testung unterzogen. Als Positivkontrolle wurde das Flavonol **Quercetin** eingesetzt.

In **Abbildung 152** wird anhand des durchgeführten MTT-Assays mit den murinen Makrophagen RAW 264.7 deutlich, dass **12** und **23** einen weitaus größeren toxischen Effekt auf diese Zelllinie ausüben, als auf die HMEC-1-Zellen. So führt bereits eine 1  $\mu\text{M}$ -Lösung von Substanz **12** zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität auf  $82,1 \pm 8,9 \%$ . Bei 5  $\mu\text{M}$  sinkt die Viabilität auf  $57,2 \pm 8,3 \%$ . Nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  **12** scheinen nur noch knapp ein Drittel der Zellen intakt zu sein ( $31,9 \pm 5,8 \%$ ). Die untersuchten Konzentrationen von Verbindung **23** erwiesen sich als weniger toxisch, allerdings ist auch hier bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Rückgang der Viabilität zu beobachten ( $71,9 \pm 16,1 \%$ ). In der höchsten Konzentration sind auch hier nur noch knapp über die Hälfte der Zellen vital.

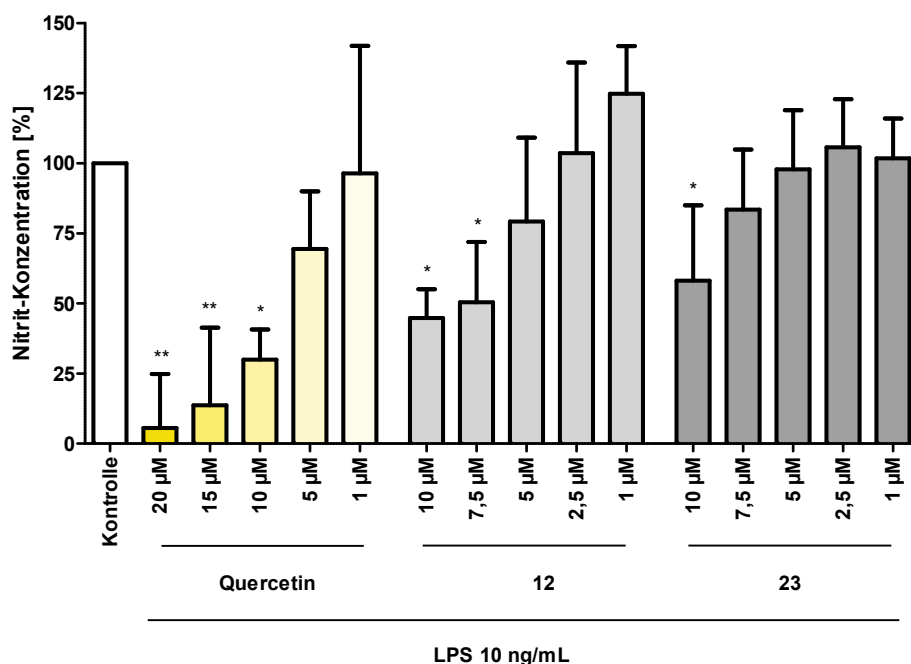
Für das als Positivkontrolle verwendete Flavonol **Quercetin** ergaben sich wesentlich schwächere toxische Effekte auf die Viabilität von RAW 264.7-Zellen (**Abbildung 152**). Erst eine 25  $\mu\text{M}$  Untersuchungslösung lässt die Viabilität signifikant unter die gewünschten 90 % auf  $70,9 \pm 17,5 \%$  sinken. Die Verdopplung bzw. Verdreifachung der Konzentration (50 und 75  $\mu\text{M}$ ) hat drastische Folgen für die Vitalität der Zellen und es wurden Werte von  $35,7 \pm 14,0 \%$  (50  $\mu\text{M}$ ) bzw.  $12,5 \pm 5,0 \%$  (75  $\mu\text{M}$ ) ermittelt.



**Abbildung 152** Viabilitäten der RAW 264.7-Zellen in Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationen der isolierten Substanzen **12** und **23** (20, 15, 10, 5 und 1 µM) und des **Quercetins** (75, 50, 25, 10 und 1 µM) als Positivkontrolle; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

Zur Erklärung der teilweise sehr großen Standardabweichungen kann die nur sehr gering ausgesäte Zellzahl von lediglich 5000 Zellen pro Well angeführt werden. Diese kann jedoch aufgrund der ausgeprägten mitochondrialen Aktivität der Zellen nicht erhöht werden, da bei der abschließenden photometrischen Vermessung der Wells, der Wert der Absorption in der Kontrolle sonst weit über 1 liegt.

Da für die Durchführung des Griess-Assays eine 16fach erhöhte Zellzahl eingesetzt wurde ( $80 \times 10^4$  Zellen je Well) und toxische Effekte bei verminderter Zellzahl häufig stärker zum Tragen kommen, wurden zur NO-Bestimmung auch Untersuchungslösungen verwendet, die im MTT-Assay zur signifikanten Reduktion der Viabilität unter 90 % führten (20, 15, 10, 5 und 1 µM für **Quercetin** und 10, 7,5, 5, 2,5 und 1 µM für **12** und **23**).



**Abbildung 153** Einfluss verschiedener Konzentrationen (10, 7,5, 5, 2,5 und 1 µM) von **12** und **23** sowie des **Quercetins** in den Konzentrationen 20, 15, 10, 5 und 1 µM auf die Nitrit-Konzentration und damit auf die NO-Konzentration im Überstand von mit LPS stimulierten RAW 264.7 Zellen; Quercetin entsprach der Positivkontrolle und die Nitrit-Konzentration nur mit LPS behandelter Zellen wurde als 100 % gesetzt; es wurden drei unabhängige Experimente in Pentaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01)

Aus **Abbildung 153** geht hervor, dass **Quercetin** die NO-Menge im Überstand bereits bei einer Konzentration von 10 µM um gut zwei Drittel auf  $30,0 \pm 8,8$  % herabsetzt. Außerdem kommt es beim Einsatz dieser Konzentration zu keinen nennenswerten Einschränkungen der Zellviabilität (**Abbildung 152**). Durch eine Erhöhung der Konzentration auf 20 µM kann die NO-Freisetzung mit  $5,6 \pm 15,7$  % fast vollständig unterbunden werden. Sollte es hier auch zu toxischen Einflüssen vergleichbar zu der 25 µM-Lösung im MTT-Assay gekommen sein, so ist die Reduktion dennoch nicht ausschließlich darauf zurückzuführen und verdeutlicht die Wirkung des Flavonols.

Auch im Griess-Assay zeigen **12** und **23** deutlich vom **Quercetin** abweichende Ergebnisse. Zwar ergibt sich vor allem für **12** in den Konzentration 7,5 µM und 10 µM eine signifikante Reduktion der ermittelten Nitrit- und damit der freigesetzten NO-Konzentration auf  $50,4 \pm 21,5$  % (7,5 µM) bzw.  $44,8 \pm 10,3$  % (10 µM). Allerdings weist die 10 µM-Untersuchungslösung von **12** auch eine Reduktion der Zellviabilität in vergleichbaren Maße auf ( $46,7 \pm 10,0$  %). Eine verminderte Toxizität bei erhöhter Zellzahl kann zwar vermutet werden und würde in diesem Fall einen positiven

Effekt der Substanz auf die NO-Freisetzung postulieren, aber in welchem Ausmaß kann anhand der hier ermittelten Daten nicht abschließend bestimmt werden. Ähnlich gestaltet sich die Auswertung der Daten für **23**. Lediglich eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  führt zu einer signifikanten Verminderung der NO-Menge ( $58,1 \pm 26,8 \%$ ). Verglichen mit der Viabilität der RAW 264.7-Zellen bei dieser Konzentration, die lediglich auf  $71,9 \pm 16,1 \%$  herabgesetzt wurde, könnte auch bei gleichbleibender Toxizität der Substanz auf eine erhöhte Zellzahl ein leichter, aber dennoch positiver Einfluss auf die NO-Freisetzung festgestellt werden. Der Unterschied zwischen dem toxischen Einfluss auf die Viabilität der Zellen und Verminderung der freigesetzten NO-Menge erwies sich aber aufgrund der ausgeprägten Schwankungen der Werte als nicht signifikant und kann damit nur als Tendenz gewertet werden.



### 3.2.3.3 Zusammenfassung und Literaturdaten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die murinen Makrophagen RAW 264.7 wesentlich sensibler auf **12** und **23** reagieren als die humanen Endothelzellen HMEC-1.

Aus dem ICAM-1-Assay geht hervor, dass durch Acylphloroglucinole vom Homoadamantan-Typ die TNF- $\alpha$  induzierte ICAM-1 Expression signifikant reduziert werden kann. Durch die hier getroffene Auswahl an getesteten Substanzen scheinen sich zusätzliche Ringschlüsse, neben der trizyklischen Grundstruktur, vor allem, wenn Sauerstoffatome miteingeschlossen werden, negativ auf die Aktivität auszuwirken. Inwiefern die Startersäure eine Rolle spielt, wurde hier nicht evaluiert. Deutlich wird außerdem, dass durch eine Peroxidstruktur die Verbindungen deutlich toxischer werden und nicht mehr den gewünschten Einfluss auf die Expression des Oberflächenmoleküls ICAM-1 besitzen (Vergleich der Verbindungen **11** und **13** mit **10** und **12**, **Abbildung 150** und **Abbildung 151**, S. 248 und 250).

Eine genaue Auswertung der Daten des Griess-Assays gestaltet sich, angesichts der deutlich unterschiedlichen Zellzahlen für die Toxizitätsbestimmung und die NO-Freisetzung, schwierig. Aufgrund der bereits beschriebenen ausgeprägten mitochondrialen Aktivität der Zellen ist eine Erhöhung der Zellzahl im MTT-Assay nicht möglich und gleichzeitig kann die Zellzahl im Griess-Assay nicht herabgesetzt werden, da sonst zu wenig NO freigesetzt würde, um es durch die Farbreaktion genau bestimmen zu können.

Wird allerdings von der Tatsache ausgegangen, dass Verbindungen auf konfluent bewachsenen Zellrasen erfahrungsgemäß weniger toxisch wirken, als auf vereinzelte Zellen, kann für beide Testsubstanzen eine Reduktion der NO-Menge beschrieben werden.

Le Bot et al. (2016) evaluierten für das **Dicyclohexylammoniumsalz des Hyperforins** eine Hemmung sowohl der VCAM-1-, als auch der ICAM-1-Expression und zusätzlich der Expression von E-Selektin. Für eine 10  $\mu$ M Untersuchungslösung des **Guttiferon J**, einem Acylphloroglucinol vom B1-Typ, konnte bereits ein inhibierender Effekt auf die TNF- $\alpha$  induzierte Expression des Oberflächenmoleküls VCAM-1 nachgewiesen werden (Rouger et al. 2016). Koeberle et al. (2009) zeigten auch für das **2, 4, 6-Trihydroxy-3-geranyl-acetophenon**, einer Substanz, die bereits in verschiedenen *Hypericum*-Arten gefunden wurde, positive Effekte auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und MCP-1 bei humanen Epithelzellen der Alveolen.

Die Fähigkeit, die LPS-induzierte NO-Freisetzung der murinen Makrophagen RAW 264.7 herabzusetzen wird in der Literatur für zahlreiche Acylphloroglucinole beschrieben. So beispielsweise

für **Hyperforin** (Huang et al. 2011), das **Garciniellipton L und M** (Ciochina und Grossman 2006), das **Sampsonol C und F** (Xin et al. 2012), zwei Verbindungen, die aus einer *Garcinia*-Art isoliert wurden (Cheng et al. 2018b) und **Hypermongone G** (Xu et al. 2015).

Die mögliche antientzündliche Wirkung des **Arzanols** ist auf die Hemmung der 5-LOX und der COX-1 sowie der Bildung des Prostaglandins E<sub>2</sub> zurückzuführen (Bauer et al. 2011). Auch zwei aus *H. empetrifolium* isolierte Acylphloroglucinole greifen durch Inhibierung sowohl der COX-1 und COX-2 als auch der 5-LOX in das komplexe Entzündungsgeschehen ein (Crockett et al. 2008).

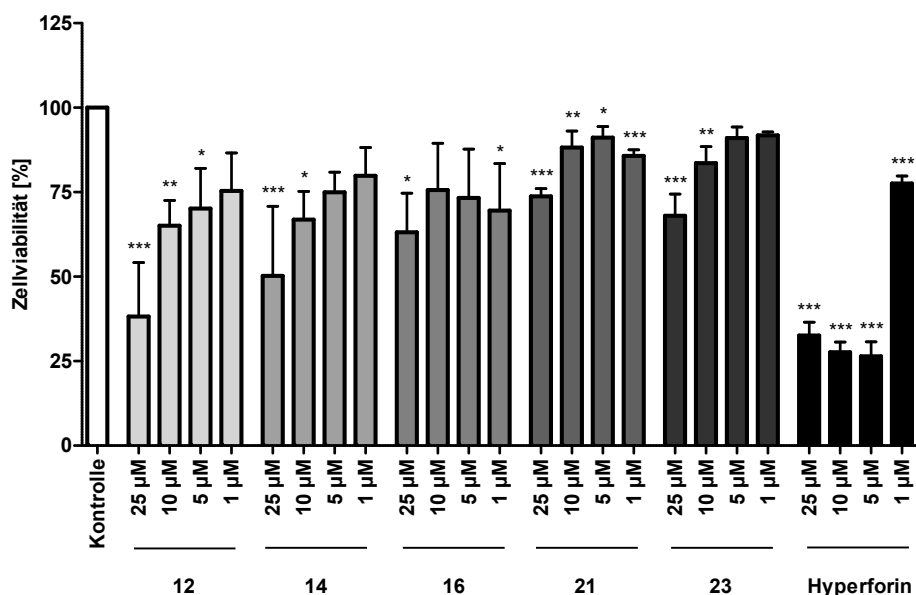
### 3.2.4 Untersuchung der neurotoxischen und der neuroprotektiven Aktivität

#### 3.2.4.1 Hemmung der Glutamat-induzierten Toxizität bei HT-22-Zellen

Die Testung auf Neurotoxizität und -protektion hat als Ziel, Verbindungen zu finden, die selbst keinen oder einen sehr geringen toxischen Einfluss auf die Viabilität von Neuronenzellen haben und diese gleichzeitig vor den schädlichen Auswirkungen bestimmter Noxen (hier: Glutamat) schützen.

Alle in diesem *in-vitro* Testsystem untersuchten Substanzen zeigten dosisabhängige Toxizität auf HT-22-Zellen. **12**, **14** und **16** führten in allen gewählten Konzentrationen zu Viabilitäten, die deutlich unter 90 % liegen, wenn auch nicht immer signifikant (**Abbildung 154**). Im Gegensatz dazu ist für **21** und **23** die Zellviabilität lediglich in der höchsten Konzentration (25  $\mu$ M) erheblich vermindert, und reicht ab 5  $\mu$ M an die geforderte „90 %-Marke“ heran (z. B.  $91,2 \pm 3,3$  % für 5  $\mu$ M von **21** und  $91,0 \pm 3,3$  % für 5  $\mu$ M von **23**).

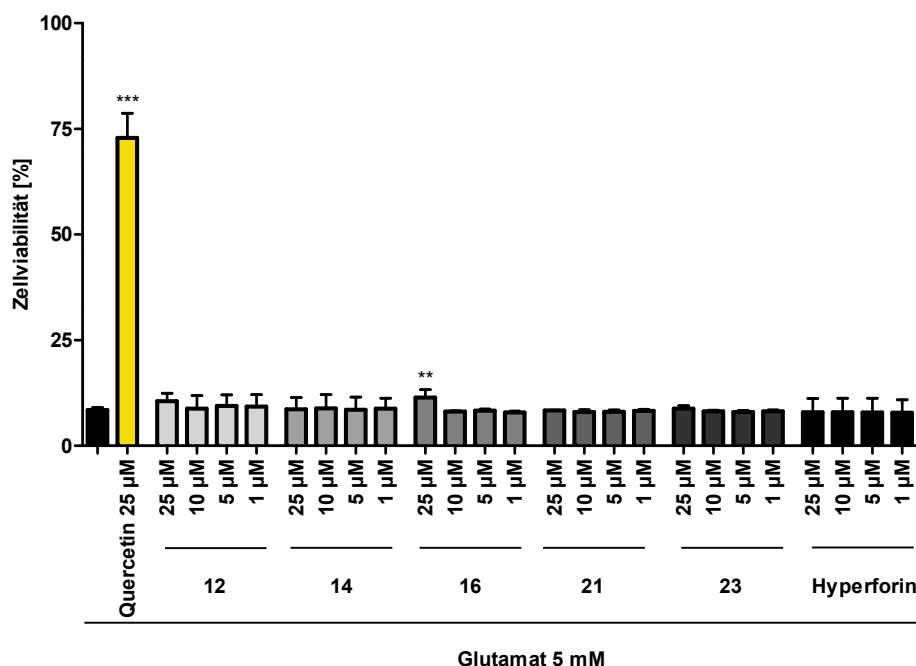
Deutlich von den Ergebnissen der isolierten Acylphloroglucinolen unterscheidet sich abermals das **Hyperforin**. Dieses verursacht in allen Lösungen  $>1$   $\mu$ M einen Rückgang der mitochondrialen Aktivität auf etwa ein Drittel ( $32,6 \pm 4,0$  % bei 25  $\mu$ M) bzw. ein Viertel ( $27,7 \pm 3,0$  % bei 10  $\mu$ M,  $26,5 \pm 4,2$  % bei 5  $\mu$ M) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In der niedrigsten Konzentration (1  $\mu$ M) zeigt sich der toxische Effekt nicht mehr so ausgeprägt und ist mit einem Wert von  $77,6 \pm 2,2$  % vergleichbar mit dem von **12**, **14** und **16**.



**Abbildung 154** Dosisabhängige Neurotoxizität der isolierten Substanzen **12**, **14**, **16**, **21** und **23** sowie des **Hyperforins**. Die Kontrollgruppe (unbehandelte HT-22-Zellen) diente als Referenzwert und wurde gleich 100 % gesetzt; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW  $\pm$  StabW dargestellt, sie wurden mittels dem Programm GraphPad einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

In **Abbildung 155** wird der protektive Effekt der getesteten Verbindungen auf HT-22-Zellen unter gleichzeitiger Zugabe von Glutamat-Lösung dargestellt. Als Positivkontrolle wurde 25 µM Quercetin verwendet.

Auf einen Blick wird ersichtlich, dass keine der getesteten Substanzen die Neuronenzellen vor dem toxischen Einfluss des Glutamats schützt. Durch den oxidativen Stress, der mittels Glutamatzugabe ausgelöst wird, kommt es zum Zelltod und es verbleibt eine Restviabilität von  $8,5 \pm 0,6$  %. Die höchste Konzentration (25 µM) von **16** zeigt zwar hochsignifikant einen Unterschied zum Wert der Zellen, die nur mit Glutamat (5 mM) behandelt wurden, jedoch liegt die Viabilität dennoch nur bei  $11,4 \pm 1,9$  %. Im Vergleich dazu wird die Viabilität bei gleichzeitiger Zugabe einer 25 µM-Lösung von Quercetin lediglich um rund ein Viertel auf  $72,9 \pm 5,8$  % reduziert.



**Abbildung 155** Dosisabhängige Neuroprotektivität der isolierten Substanzen **12**, **14**, **16**, **21** und **23** sowie des **Hyperforins** der HT-22-Zellen bei gleichzeitiger Stimulierung mit 5 mM Glutamat; die Werte wurden prozentual auf eine Kontrollgruppe (unbehandelte, nicht mit Glutamat versetzte Zellen), die als 100 % gesetzt wurde, bezogen, der maximale Effekt von Glutamat auf die Neuronenzellen wurde mit Zellen ermittelt, die nur mit Glutamat behandelt wurden, Quercetin (25 µM) entspricht der Positivkontrolle; es wurden drei unabhängige Experimente in Hexaplikaten durchgeführt; Daten sind als MW ± StabW dargestellt, sie wurden mittels dem Programm GraphPad einer einfachen ANOVA mit einem Dunnett Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

Da die Durchführung des Neurotoxizitäts- und des Neuroprotektions-Assays parallel verlief, wurden auch Konzentrationen mit stark negativem Einfluss auf die Viabilität der Neuronenzellen getestet. Aufgrund der Tatsache, dass sich auch für die weniger toxischen Untersuchungslösungen kein neuroprotektiver Effekt abzeichnete, wurde auf eine Anpassung der Konzentrationen verzichtet.

### 3.2.4.2 Zusammenfassung und Literaturdaten

Gemäß der Arbeit von Volkov (2017) können Acylphloroglucinole aufgrund ihrer Toxizität auf HT-22-Zellen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe weist bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  toxische Effekte auf die Viabilität der Neuronenzellen auf, die sich konzentrationsabhängig steigern, wohingegen die zweite Gruppe bis 10  $\mu\text{M}$  einen gleichbleibenden und nur schwach ausgeprägten Einfluss auf die Viabilität der Zellen zeigt, der in der höchsten Konzentration sprunghaft ansteigt. Anhand dieser Definition können zwei der getesteten Substanzen, **12** und **14**, der ersten Gruppe und die restlichen Verbindungen, **16**, **21** und **23**, der zweiten Gruppe zugeordnet werden. Auch in dieser *in-vitro* Testung nimmt **Hyperforin** eine Sonderstellung ein und lässt sich in keine der beiden Gruppen einordnen.

Die aus *H. triquetrifolium* isolierten Acylphloroglucinole lassen sich unterteilen in monozyklische Verbindungen mit zusätzlichem Ringschluss zum Chroman in *ortho*-Position und die bizyklischen Komponenten zum einen vom A-Typ, die ebenfalls eine zusätzliche Zyklisierung zum Chroman in *ortho*- oder *para*-Position aufweisen, zum anderen vom B1-Typ (Volkov 2017). Lediglich für **Triquetriborin**, das Acylphloroglucinol vom B1-Typ, lässt sich in der höchsten Konzentration ein leichter positiver Effekt auf die Neuroprotektivität ausmachen, der möglicherweise durch den zytotoxischen Effekt der Substanz auf die Neuronenzellen überlagert wird.

Volkov (2017) führt außerdem eine Forschungsarbeit von Sebastian Pitzl auf, in der ebenfalls einige monozyklische Acylphloroglucinole, die teilweise durch zusätzliche Zyklisierung in *ortho*- bzw. *para*-Position ein Chroman Grundgerüst bilden, auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften getestet wurden. Die meisten der Substanzen können anhand ihrer toxischen Einflüsse auf die Viabilität der HT-22-Zellen in die bereits oben erwähnten Gruppen unterteilt werden. Doch sind auch Verbindungen vorhanden, die in keiner Konzentration Anzeichen für Toxizität zeigen. Durch fast alle Substanzen wird eine signifikante Reduktion der Glutamat-induzierten Toxizität und damit ein Anstieg der Viabilitäten der HT-22-Zellen erreicht, die zum Teil vergleichbar mit der Positivkontrolle Quercetin sind.

Einige Acylphloroglucinolderivate, die aus *H. scabrum* isoliert wurden, zeigen eine deutliche Hemmung der Glutamat-induzierten Neurotoxizität an SK-N-SH-Zellen, die vergleichbar mit der der Positivkontrolle Resveratrol ist (alle in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$ ) (Gao et al. 2016b; Gao et al. 2016a). Bei SK-N-SH handelt es sich um eine humane Neuroblastom Zelllinie. Die untersuchten Substanzen leiten sich hauptsächlich von einem Acylphloroglucinol vom A-Typ ab. Auch ein komplexeres Adamantan-Derivat, das allerdings aus einem B1-Typ-Acylphloroglucinol entsteht,

wurde getestet. Auch die beiden A-Typ-Acylphloroglucinole **Hyperascyrin A** und **H** (10  $\mu$ M), die aus *H. ascyron* gewonnen wurden, können den neurotoxischen Effekt von Glutamat auf SK-N-SH-Zellen abmildern (Hu et al. 2018). Eine neuroprotektive Wirkung wird auch für zahlreiche Acylphloroglucinole vom A-Typ in einem *in-vitro* Modell an PC12-Zellen, die mit Kortikosteron stimuliert wurden, gezeigt (Zhou et al. 2016a). An der PC12-Zelllinie wird auch der positive Einfluss der beiden Acylphloroglucinole **Hypermonin A** und **B** aus *H. monogynum* auf die Neuroprotektivität evaluiert (Zeng et al. 2018). Das neuroprotektive Prinzip der aus *H. henryi* isolierten Acylphloroglucinole, **Hyphenron A**, **C** und **D**, basiert auf der Hemmung der Acetylcholinesterase (Yang et al. 2014).

## 4 ZUSAMMENFASSUNG

Die Gattung *Hypericum* L. gehört mit acht weiteren zur Familie der Hypericaceae und stellt mit etwa 450 bekannten Arten die mit Abstand größte Gattung dar. Um die Vielzahl an Arten weiter zu klassifizieren, erfolgte eine Unterteilung in 36 Sektionen, an der maßgeblich der englische Botaniker N.K.B. Robson beteiligt war. Das in dieser Arbeit untersuchte *Hypericum hirsutum* L. wird mit 27 weiteren Arten der Sektion 18 *Taeniocarpium* zugeordnet. Das Spektrum an Sekundärmetaboliten, insbesondere der Acylphloroglucinole, der Pflanze, aber auch der gesamten Sektion ist bis heute weitestgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Petrolether-Extrakt aus den oberirdischen, blühenden Teilen von *H. hirsutum* DC- und auch NMR-geleitet fraktioniert. Zum Einsatz kamen dabei Flash-Chromatographie an Kieselgel und RP-18, Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie (CPC), sowie semi-präparative HPLC an RP-18. Mithilfe von 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie zusammen mit der hochauflösenden Massenspektrometrie konnten die Strukturen der 30 erhaltenen Verbindungen aufgeklärt werden. Die isolierten Substanzen lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen:

Die Erste stellen die Acylphloroglucinole vom A-Typ dar, die durch eine C-5-C-1-Verknüpfung eines Isoprenrestes ein bizyklisches Gerüst aufweisen. Die Substanzen **1** bis **3** enthalten außerdem eine Furano-Einheit, welche 5-*para* (**1**), 3-*para* (**2**) oder 3-*ortho* (**3**) zur Acylgruppe ausgebildet wurde. **4** besitzt eine komplexe trizyklische Grundstruktur, die bislang gänzlich unbekannt ist. In der zweiten Gruppe werden fünf Acylphloroglucinole mit einem Adamantan-Körper (**5** bis **9**) vereint. Dieser entsteht aus einem A-Typ Acylphloroglucinol mit zusätzlichem Ringschluss zwischen C-3 und einem Prenylrest an C-7. **5** und **6** weisen durch Oxidation des Prenylrestes eine Oxiran-Einheit auf, wohingegen es bei **7** bis **9** zur Ausbildung eines zusätzlichen Fünfrings durch die Verknüpfung zweier Isopreneinheiten kommt. Die größte Gruppe umfasst 16 Vertreter (**10** bis **25**) und zeichnet sich durch ein Homoadamantan-Grundgerüst aus, welches vergleichbar dem Adamantan gebildet wird. **10** bis **13** beinhalten keinen weiteren Ringschluss. Bei den Verbindungen **14** bis **16** liegt durch Ringschluss zwischen Prenylrest und Phloroglucinring, bei den Verbindungen **17** und **18** durch Verknüpfung zweier Isoprenreste, eine Furano-Einheit vor. Charakteristisch für **19** bis **21** ist, neben dem Homoadamantan-Gerüst, ein Siebenring der eine Peroxid-Struktur beinhaltet. Die letzten vier Substanzen (**22** bis **25**) bilden, analog **7** bis **9**, einen weiteren Fünfring aus. **26** und **27** sind Acylphloroglucinole vom B I-Typ und zeichnen sich durch die vorhandene Keto-Enol-Tautomerie aus. Die restlichen drei Substanzen **28** bis **30** stellen keine



Acylphloroglucinole im klassischen Sinne dar, leiten sich aber von dieser Substanzklasse ab. So können die **28** und **29** als 4-*nor*-Homoadamantan-Derivate angesehen werden. **30** entsteht vermutlich auf demselben Biosyntheseweg wie die Acylphloroglucinole, allerdings werden nur zwei Malonyl-Einheiten an die Startersäure kondensiert und nach Hydroxylierung der Polyketosäure erfolgt eine spontane Lacton-Bildung.

Solche komplexen Acylphloroglucinol-Derivate werden hier das erste Mal für eine *Hypericum*-Art aus Sektion 18 beschrieben. Vergleichbare Strukturen finden sich vor allem in den Sektionen 3 *Ascyreia*, 9 *Hypericum* und 9c *Sampsonia*.

Einige der in dieser Arbeit isolierten Verbindungen wurden auf ihr antiproliferatives *in vitro* Potential gegen humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) getestet und mit dem des Hyperforins verglichen, dem anti-angiogene Eigenschaften zugesprochen werden. Es ergaben sich IC<sub>50</sub>-Werte in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 22 µM. Das **Hyperforin** sticht in diesem Assay mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,8 µM deutlich hervor. Das gemeinsame Merkmal der mit Abstand aktivsten Substanzen **11** und **13** ist eine Peroxid-Struktur, auf die sich dieses Potential möglicherweise zurückführen lässt. Einen Effekt, auf die Hemmung der Migration der HMEC-1-Zellen in einen zellfreien Spalt, lässt sich für alle getesteten Substanzen nicht nachweisen.

In einem weiteren *in vitro* Testsystem wurden neun PPAPs vom Homoadamantan-Typ und **Hyperforin** auf ihre Fähigkeit untersucht, die TNF- $\alpha$ -induzierte ICAM-1-Expression von HMEC-1-Zellen zu reduzieren, um erste Hinweise zu erhalten ob sie anti-inflammatorische Eigenschaften haben könnten. **10**, **12**, **22** und **23** vermögen in der höchsten Konzentration eine Reduktion des Oberflächenmoleküls auf 50 bis 60 %, was der Aktivität der Positivkontrolle **Parthenolid** nahekommt, aber auch die 25 µM Untersuchungslösung reduziert die ICAM-1-Expression noch signifikant. **12** und **23** wurden anschließend im sogenannten Griess-Assay getestet, um ihren Einfluss auf die NO-Freisetzung von mit LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen zu evaluieren. Aufgrund der ausgeprägten Eigentoxizität der Verbindungen auf die Zelllinie und die deutlich unterschiedlichen Zellzahlen bei der Durchführung des MTT- und des Griess-Assays ist eine konkrete Auswertung der Testung unmöglich.

Abschließend wurden **12**, **14**, **16**, **21**, **23** und **Hyperforin** an der Neuronen-Zelllinie HT-22 getestet, um Hinweise zu erhalten, ob sie eine mögliche neuroprotektive Aktivität haben. In einer ersten Versuchsreihe erwiesen sich alle Testsubstanzen in den Konzentrationen 25, 10, 5 und 1 µM als

toxisch und setzten die Zellviabilität teilweise hochsignifikant herab. Gleichzeitig war für alle verwendeten Konzentrationen kein Einfluss auf die Glutamat-induzierte Toxizität auf HT-22-Zellen zu erkennen.

## 5 SUMMARY

Together with eight others, the genus *Hypericum* L. belongs to the family Hypericaceae and represents with nearly 450 known species by far the biggest one. To classify the large number of species, there was a division of the genus in 36 sections especially by the British botanist N.K.B. Robson. *Hypericum hirsutum* L., the object of the present study, and 27 further species are assigned to section 18 *Taeniocarpium*. The spectrum of secondary metabolites, in particular the acylphloroglucinols not only of this species but also of the whole section is hitherto unknown.

In this study, the petroleum ether extract of the aerial, flowering parts of *H. hirsutum* was fractionated TLC- and NMR-guided. For the fractionation flash chromatography on silica gel and RP-18, centrifugal partition chromatography, as well as semi-preparative HPLC on RP-18 was used. Performing 1D- and 2D-NMR together with HRESI-MS techniques led to the elucidation of the structure of the 30 isolated compounds. Obtained substances can be divided in different groups:

The first one comprises type A acylphloroglucinols which show a bicyclic scaffold because of a C-5-C-1-linked isoprene unit. Furthermore, substances **1** to **3** have an additional furano-subunit, which was formed either 5-*para* (**1**), 3-*para* (**2**) or 3-*ortho* (**3**) to the position of the acyl side chain. Substance **4** has a complex tricyclic scaffold that is hitherto completely unknown. The second group combines five acylphloroglucinols with an adamantan backbone (**5** to **9**). This framework develops from an A-type acylphloroglucinol with a ringclosure between C-3 and a prenyl side chain in position 7. The substances **5** and **6** show because of the oxidation of the prenyl unit an oxiran moiety, whereas the substances **7** to **9** have an additional five-membered ringsystem due to the linkage of two isoprene units. The biggest group includes 16 representatives and is characterized by a homoadamantan scaffold. This one is built comparable with the adamantan. The substances **10** to **13** have no further ringclosure. There is a furano subunit on the basis of a linkage of a prenyl moiety and the phloroglucinol for compounds **14** to **16** and because of a ringclosure between two isoprene units for compound **17** and **18**. Characteristic for substances **19** to **21** besides the homoadamantan scaffold is a seven-membered ringsystem with a peroxid structure. The last four compounds (**22** to **25**) have an additional five-membered ring system that is comparable to substances **7** to **9**. The substances **26** and **27** are type B I acylphloroglucinols, which are characterized by a keto-enol tautomerism. The remaining three substances **28** to **30** are not represent typical acylphloroglucinols but are derived from this class of substances. The compounds **28** and **29** can be termed as 4-*nor*-homoadamantan derivatives. In addition, compound **30** arises probably on the same biosynthetic pathway like the acylphloroglucinols. In this

case, just two molecules of malonyl-CoA react with a CoA-activated starter acid and after a hydroxylation of the polyketide a spontaneous forming of a lactone follows.

To best of our knowledge, such complex acylphloroglucinol derivatives for section 18 are here reported for the first time. Comparable structures were described especially for section 3 *Ascyreia*, 9 *Hypericum* and 9c *Sampsonia*.

In this study some of the isolated compounds were tested for their antiproliferative *in vitro* potential on human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and compared with Hyperforin whom an anti-angiogenic activity can be awarded. The IC<sub>50</sub> values are in the range 2.5 to 22 µM. With an IC<sub>50</sub> value of 0.8 µM **Hyperforin** stands out clearly. The common characteristic detail of the most active substances **11** and **13** is the peroxid moiety, which is maybe responsible for the activity. An effect on the inhibition of the migration of HMEC-1-cells cannot be proved for all tested compounds.

In another in vitro assay, nine homoadamantan-type PPAPs and **Hyperforin** were tested on their ability to reduce the TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression of HMEC-1 cells, which could be indicative for their anti-inflammatory capacity. **10**, **12**, **22** and **23** are able to reduce the surface molecule in the highest concentration between 50 to 60 %, which is comparable with the activity of the positive control **Parthenolid**. But also the lower concentrations show a significant reduction of the ICAM-1-expression. The compounds **11** and **23** were subsequent tested in the so-called Griess-Assay to evaluate their influence on the NO-release of LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Due to the distinct toxicity of the substances on the cell line and the very various number of cells used for the MTT- and the Griess a definite interpretation of the assay is not possible.

Last the substances **12**, **14**, **16**, **21**, **23** and **Hyperforin** were tested on the neuronal cell line HT-22. In the first series of experiments all compounds show a toxic effect on the HT-22 cells in concentrations of 25 µM, 10 µM, 5 µM and 1 µM and reduce their viability partially highly significant. Simultaneous there was no influence on the glutamate-induced toxicity on HT-22 cells noticeable.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Ø</b>                | Durchmesser   |
| <b>°C</b>               | Grad Celsius  |
| <b>%</b>                | Prozent   |
| <b>1D</b>               | Ein-dimensional                                     |
| <b><sup>1</sup>H</b>    | Wasserstoff-Isotop mit einem Neutron                |
| <b><sup>13</sup>C</b>   | Kohlenstoff-Isotop mit 13 Neutronen                 |
| <b>2D</b>               | Zwei-dimensional                                    |
| <b>δ</b>                | Chemische Verschiebung                              |
| <b>µg</b>               | Mikrogramm  |
| <b>µL</b>               | Mikroliter  |
| <b>µm</b>               | Mikrometer  |
| <b>µM</b>               | Mikromolar  |
| <b>φ</b>                | Torsionswinkel                                      |
| <b>Å</b>                | Ångström  |
| <b>APG</b>              | Angiosperm Phylogeny Group                          |
| <b>BPAP</b>             | Bizyklisches polyprenyliertes Acylphloroglucinol    |
| <b>BSA</b>              | Bovines Serum Albumin                               |
| <b>bzw.</b>             | Beziehungsweise                                     |
| <b>ca.</b>              | Circa   |
| <b>CD</b>               | Circular dichroism, Zirkulardichroismus             |
| <b>CDCl<sub>3</sub></b> | Deuteriertes Chloroform                             |
| <b>C<sub>end</sub></b>  | Endkonzentration                                    |
| <b>CH</b>               | Schweiz   |
| <b>cm</b>               | Zentimeter  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>   | Kohlenstoffdioxid                                   |
| <b>COSY</b>             | Correlated spectroscopy                             |
| <b>CPC</b>              | Centrifugal Partition Chromatography                |
| <b>d</b>                | Dublett   |
| <b>DAD</b>              | Diodenarray-Detektor                                |
| <b>DC</b>               | Dünnschichtchromatographie/Dünnschichtchromatogramm |
| <b>dd</b>               | Dublett vom Dublett                                 |
| <b>DE</b>               | Deutschland   |
| <b>d.h.</b>             | Das heißt   |
| <b>DMSO</b>             | Dimethylsulfoxid                                    |
| <b>ECGM</b>             | Endothelial Cell Growth Medium                      |
| <b>EDTA</b>             | Ethylendiamintetraessigsäure                        |
| <b>ESI</b>              | Electrospray Ionization                             |
| <b>EtOAc</b>            | Ethylacetat   |
| <b>FACS</b>             | Fluorescence-Activated Cell Sorting                 |
| <b>FKS</b>              | Fetales Kälber Serum                                |

---

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>FITC</b>                    | Fluorescein Isothiocyanat  |
| <b>FM</b>                      | Fließmittel  |
| <b>FR</b>                      | Frankreich   |
| <b>FSC</b>                     | Forward-Scattered Light (Vorwärtsstreulicht)                           |
| <b>GSH</b>                     | Glutathion   |
| <b>g</b>                       | Gramm  |
| <b>h</b>                       | Stunden  |
| <b>H.</b>                      | <i>Hypericum</i>   |
| <b>HMBC</b>                    | Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy                   |
| <b>HMEC-1</b>                  | Human Microvascular Endothelial Cells-1                                |
| <b>HPLC</b>                    | High Performance Liquid Chromatography                                 |
| <b>HRMS</b>                    | High Resolution Mass Spectroscopy (hochauflösende Massenspektrometrie) |
| <b>HSQC</b>                    | Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy                  |
| <b>Hz</b>                      | Hertz  |
| <b>i. d. R</b>                 | In der Regel   |
| <b>ICAM-1</b>                  | Intercellular Adhesion Molecule-1                                      |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferon $\gamma$  |
| <b>IgSF</b>                    | Immunglobulin-Superfamilie   |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Interleukin 1 $\beta$  |
| <b>iNOS</b>                    | Induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase                                  |
| <b>J</b>                       | Kopplungskonstante   |
| <b>JP</b>                      | Japan  |
| <b>K</b>                       | Kelvin   |
| <b>l</b>                       | Länge  |
| <b>L</b>                       | Liter  |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolysaccharid  |
| <b>M</b>                       | Molar  |
| <b>m</b>                       | Multipllett  |
| <b>m/V</b>                     | Masse/Volumen  |
| <b>m/z</b>                     | Masse-Ladungs-Verhältnis   |
| <b>mAU</b>                     | Milliabsorptionunits   |
| <b>MeCN</b>                    | Acetonitril  |
| <b>MeOH</b>                    | Methanol   |
| <b>mg</b>                      | Milligramm   |
| <b>MHz</b>                     | Megahertz  |
| <b>Min</b>                     | Minute   |
| <b>mL</b>                      | Milliliter   |
| <b>mm</b>                      | Millimeter   |
| <b>MPAP</b>                    | Monozyklischen polyprenyliertes Acylphloroglucinol                     |
| <b>MS</b>                      | Massenspektrometrie  |
| <b>MTT</b>                     | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid                 |
| <b>mult</b>                    | Multiplizität  |
| <b>N</b>                       | Nord   |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>       | Natriumhydrogencarbonat                                 |
| <b>NaNO<sub>2</sub></b>        | Natriumnitrit   |
| <b>ng</b>                      | Nanogramm   |
| <b>nL</b>                      | Nanoliter   |
| <b>nm</b>                      | Nanometer   |
| <b>NMDA</b>                    | N-methyl-D-aspartat                                     |
| <b>NMR</b>                     | Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanzspektroskopie)  |
| <b>NO</b>                      | Stickstoffmonoxid                                       |
| <b>NO</b>                      | Nordost   |
| <b>NW</b>                      | Nordwest  |
| <b>O</b>                       | Ost   |
| <b>PBS</b>                     | Phosphate Buffered Saline                               |
| <b>PE</b>                      | Petrolether   |
| <b>PPAP</b>                    | Polyzyklisches polyprenyliertes Acylphloroglucinol      |
| <b>ppm</b>                     | Parts per million                                       |
| <b>RP-18</b>                   | Reversed Phase 18                                       |
| <b>RPMI</b>                    | Roswell Park Memorial Institute                         |
| <b>ROS</b>                     | Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)    |
| <b>S</b>                       | Süd   |
| <b>s</b>                       | Singulett   |
| <b>Sek</b>                     | Sekunde   |
| <b>SSC</b>                     | Side-Scattered Light (Seitenstreulicht)                 |
| <b>SO</b>                      | Südost  |
| <b>StabW</b>                   | Standardabweichung                                      |
| <b>SW</b>                      | Südwest   |
| <b>t</b>                       | Triplett  |
| <b>T</b>                       | Temperatur  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumor Necrosis Factor $\alpha$                          |
| <b>U/Min</b>                   | Umdrehungen pro Minute                                  |
| <b>US</b>                      | Vereinigte Staaten von Amerika                          |
| <b>UV/Vis</b>                  | Ultravioletter/sichtbarer Bereich                       |
| <b>v. Chr.</b>                 | vor Christus  |
| <b>V/V</b>                     | Volumen/Volumen [%], Volumenprozent                     |
| <b>V</b>                       | Volumen   |
| <b>W</b>                       | West  |
| <b>WinMDI</b>                  | Windows Multiple Documents Interface for Flow Cytometry |
| <b>z. B.</b>                   | zum Beispiel  |

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

### A

- Abe, S.; Tanaka, N.; Kobayashi, J. **(2012)**: Prenylated acylphloroglucinols, chipericumins A-D, from *Hypericum chinense*. In: *J. Nat. Prod.* 75(3), S. 484–488
- Ades, E.W.; Candal, F.J.; Swerlick, R.A.; George, V.G.; Summers, S.; Bosse, D.C.; Lawley, T.J. **(1992)**: HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. In: *J. Invest. Dermatol.* 99(6), S. 683–690
- Akhlaq, M.S.; Schuchmann, H.-P.; von Sonntag, C. **(1987)**: The reverse of the ‘Repair’ reaction of thiols: H-abstraction at carbon by thiyl radicals. In: *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 51(1), S. 91–102
- Albini, A.; Noonan, D.M.; Ferrari, N. **(2007)**: Molecular pathways for cancer angioprevention. In: *Clin. Cancer Res.* 13(15), S. 4320–4325
- Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. **(2001)**: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. In: *Biochem. J.* 357, S. 593–615
- Apaydin, E.A.; Maher, A.R.; Shanman, R.; Booth, M.S.; Miles, J.N.V.; Sorbero, M.E., Hempel, S. **(2016)**: A systematic review of St. John’s wort for major depressive disorder. In: *Syst. Rev.* 5 (1), S. 1–25
- Ascher, P.; Nowak, L. **(1987)**: Electrophysiological studies of NMDA receptors. In: *Trends Neurosci.* 10(7), S. 284–288
- Athanasas, K.; Magiatis, P.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, A.-L.; Pratsinis, H.; Kletsas, D. **(2004)**: Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. In: *J. Nat. Prod.* 67(6), S. 973–977
- Ausprunk, D.H.; Folkman, J. **(1977)**: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. In: *Microvasc. Res.* 14(1), S. 53–65

### B

- Baggett, S.; Mazzola, E.P.; Kennelly, E.J. **(1998)**: The benzophenones: Isolation, structural elucidation and biological activities. In: Rahman, A.-U. (Hg.): *Studies in Natural Products*, Band. 32: Amsterdam/Lausanne/New York, Elsevier, S. 721–771
- Bauer, J.; Koeberle, A.; Dehm, F.; Pollastro, F.; Appendino, G.; Northoff, H.; Rossi, A.; Sautebin, L.; Werz, O. **(2011)**: Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy *in vivo*. In: *Biochem. Pharmacol.* 81(2), S. 259–268



- Beg, A.A.; Ruben, S.M.; Scheinman, R.I.; Haskill, S.; Rosen, C.A.; Baldwin, A.S. **(1992)**: I $\kappa$ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- $\kappa$ B: a mechanism for cytoplasmic retention. In: *Genes Dev.* 6(10), S. 1899–1913
- Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. **(2005)**: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely, M.R. (Hg.): *Biotechnology annual review*, Band. 11: Amsterdam, Elsevier Science, S. 127–152
- Bienz, S. A.; Bigler, L.; Fox, T.; Meier, H. **(2016)**: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag, 9. Aufl.
- Biljali, S.; Momekov, G.; Nedialkov, P.; Zheleva-Dimitrova, D.; Kitanov, G.; Momekova, D.; Stoyanov, N.; Guenova, M.; Michova, A.; Karaivanova, M. **(2012)**: *In vitro* investigation of the antiproliferative and proapoptotic effects of hyperatomarin – a bicyclic prenylated acylphloroglucinol from *Hypericum annulatum* Moris subsp. *annulatum* against human tumor and endothelial cells. In: *J. Pharm. Technol. Drug Res.* 1(1), S. 1–9
- Bittrich, V.; Amaral, M.d.C.E.; Machado, S.M.F.; Marsaioli, A.J. **(2003)**: Floral resin of *Tovomitopsis saldanhae* (Guttiferae) and 7-*epi*-nemorosone: Structural revision. In: *Z. Naturforsch. C, J. Biosci.* 58(9-10), S. 643–648
- Bogdan, C. **(2001)**: Nitric oxide and the immune response. In: *Nat. Immunol.* 2(10), S. 907–916
- Boxberger, H.J. **(2007)**: *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Einführung in Grundlagen und Techniken*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag
- Bridges, R.J.; Natale, N.R.; Patel, S.A. **(2012)**: System x $_c^-$  cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. In: *Br. J. Pharmacol.* 165(1), S. 20–34
- Bridi, H.; Meirelles, G.d.C.; von Poser, G.L. **(2018)**: Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. In: *Phytochemistry* 155, S. 203–232
- Butterweck, V., Petereit, F., Winterhoff, H., Nahrstedt, A. **(1998)**: Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. In: *Planta Med.* 64(4), S. 291–294
- Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Winterhoff, H. **(2000)**: Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. In: *Planta Med.* 66(1), S. 3–6

## C

- Camas, N.; Radusiene, J.; Ivanauskas, L.; Jakstas, V.; Kayikci, S.; Cirak, C. **(2014)**: Chemical composition of *Hypericum* species from the *Taeniocarpium* and *Drosanthe* sections. In: *Plant Syst. Evol.* 300(5), S. 953–960
- Carmeliet, P. **(2000)**: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. In: *Nat. Med.* 6(4), S. 389–395

- Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. In: *Nat. Med.* 9(6), S. 653–660
- Chan, P.H.; Fishman, R.A. (1980): Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. In: *J. Neurochem.* 35(4), S. 1004–1007
- Chatterjee, S.S., Bhattacharya, S.K., Wonnemann, M., Singer, A., Muller, W.E. (1998a): Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. In: *Life Sci.* 63(6), S. 499–510
- Chatterjee, S.S., Noldner, M., Koch, E., Erdelmeier, C. (1998b): Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility. In: *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), S. 7–15
- Chavakis, E.; Choi, E.Y.; Chavakis, T. (2009): Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. In: *Thromb. Haemost.* 102(2), S. 191–197
- Chen, J.-J.; Chen, H.-J.; Lin, Y.-L. (2014): Novel polyprenylated phloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. In: *Molecules* 19(12), S. 19836–19844
- Chen, X.-Q.; Li, Y.; Cheng, X.; Wang, K.; He, J.; Pan, Z.-H.; Li, M.-M.; Peng, L.-Y.; Xu, G.; Zhao, Q.-S. (2010): Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols and chromone O-glucosides from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides*. In: *Chem. Biodivers.* 7(1), S. 196–204
- Chen, X.-Q.; Li, Y.; Li, K.-Z.; Peng, L.-Y.; He, J.; Wang, K.; Pan, Z.-H.; Cheng, X.; Li, M.-M.; Zhao, Q.-S.; Xu, G. (2011): Spirocyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum beanii*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 59(10), S. 1250–1253
- Cheng, L.-Y.; Chen, C.-L.; Kuo, Y.-H.; Chang, T.-H.; Lin, I.-W.; Wang, S.-W.; Chung, M.-I.; Chen, J.-J. (2018a): Polyphenylated polycyclic acylphloroglucinol: angiogenesis inhibitor from *Garcinia multiflora*. In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 28(10), S. 1860–1863
- Cheng, L.-Y.; Tsai, Y.-C.; Fu, S.-L.; Cheng, M.-J.; Sung, P.-J.; Chung, M.-I.; Chen, J.-J. (2018b): Acylphloroglucinol derivatives from *Garcinia multiflora* with anti-inflammatory effect in LPS-induced RAW264.7 macrophages. In: *Molecules* 23(10), S. 2587
- Choi, D.W. (1988): Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous System. In: *Neuron* 1(8), S. 623–634
- Christian, O.; McLean, S.; Reynolds, W.F.; Jacobs, H. (2008): Prenylated benzophenones from *Hypericum hypericoides*. In: *Nat. Prod. Commun.* 3(11), S. 1781–1786
- Christian, O.E.; Henry, G.E.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W.F. (2001): Prenylated benzophenone derivatives from *Clusia havetioides* var. *stenocarpa*. In: *J. Nat. Prod.* 64(1), S. 23–25
- Ciochina, R.; Grossman, R.B. (2006): Polycyclic polyphenylated acylphloroglucinols. In: *Chem. Rev.* 106(9), S. 3963–3986
- Clancy, R.M.; Amin, A.R.; Abramson, S.B. (1998): The role of nitric oxide in inflammation and immunity. In: *Arthritis Rheum.* 41(7), S. 1141–1151

- Colasanti, M.; Persichini, T. **(2000)**: Nitric oxide: An inhibitor of NF- $\kappa$ B/Rel system in glial cells. In: *Brain Res. Bull.* 52(3), S. 155–161
- Cordoba, E.; Salmi, M.; León, P. **(2009)**: Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. In: *J. Exp. Bot.* 60(10), S. 2933–2943
- Crockett, S.; Kunert, O.; Jacob, M.; Bauer, R.; Nedialkov, P. **(2010)**: Antimicrobial acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum linarioides* (Hypericaceae). In: *Planta Med.* 76(12) – P430
- Crockett, S.L.; Robson, N.K.B. **(2011)**: Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. In: *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5(Special Issue 1), S. 1–13
- Crockett, S.L.; Wenzig, E.-M.; Kunert, O.; Bauer, R. **(2008)**: Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. In: *Phytochem. Lett.* 1(1), S. 37–43
- Cronstein, B.N.; Weissmann, G. **(1993)**: The adhesion molecules of inflammation. In: *Arthritis Rheum.* 36(2), S. 147–157
- Cruz, F.G.; Teixeira, J.S.R. **(2004)**: Polyprenylated benzophenones with a tricyclo [4.3.1.1<sup>3,8</sup>]undecane skeleton from *Clusia obdeltifolia*. In: *J. Braz. Chem. Soc.* 15(4), S. 504–508
- Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A.L.; Rastrelli, L. **(1998)**: Chemistry and biological activity of polyisoprenylated benzophenone derivatives. In: Rahman, A.-U. (Hg.): *Studies in Natural Products*, Band. 32: Amsterdam/Lausanne/New York, Elsevier, S. 671–720
- Cuesta-Rubio, O.; Velez-Castro, H.; Frontana-Urbe, B.A.; Cárdenas, J. **(2001)**: Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. In: *Phytochemistry* 57(2), S. 279–283
- Czygan, F.-C. **(2003)**: Vom 2500 Jahre alten Apotropaikum zum aktuellen Antidepressivum. Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts. In: *Pharm. Unserer Zeit* 32(3), S. 184–190

## D

- Dakanali, M.; Theodorakis, E.A. **(2011)**: Polyprenylated phloroglucinols and xanthenes. In: Poupon, E.; Nay, B. (Hg.): *Biomimetic organic synthesis*, Band. 163: Weinheim, Wiley-VCH, S. 433–467
- Davis, J.B.; Maher, P. **(1994)**: Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. In: *Brain Res.* 652(1), S. 169–173
- de Almeida, M.F.; Guedes, M.L.S.; Cruz, F.G. **(2011)**: Lathrophytoic acids A and B: Two novel polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Kielmeyera lathrophyton*. In: *Tetrahedron Lett.* 52(52), S. 7108–7112
- de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A.J. **(1996)**: Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. In: *Tetrahedron Lett.* 37(36), S. 6427–6430

- de Oliveira, C.M.A.; Porto, A.L.M.; Bittrich, V.; Marsaioli, A.J. **(1999)**: Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. In: *Phytochemistry* 50(6), S. 1073–1079
- dos Santos, M.H.; Nagem, T.J.; Braz-Filho, R.; Lula, I.S.; Speziali, N.L. **(2001)**: Complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the tetraisoprenylated benzophenone 15-epiclusi-anone. In: *Magn. Reson. Chem.* 39(3), S. 155–159
- Drawert, F.; Beier, J. **(1974a)**: Bildung und Weiterreaktion von Acylvorstufen der Hopfenbitterstoffe. In: *Phytochemistry* 13(10), S. 2149–2155
- Drawert, F.; Beier, J. **(1974b)**: Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-Essigsäure in Hopfenbitterstoffe. In: *Phytochemistry* 13(12), S. 2749–2753
- Drawert, F.; Beier, J. **(1976a)**: Aminosäuren als Vorstufe der Acylseitenkette der Hopfenbitterstoffe. In: *Phytochemistry* 15(11), S. 1693–1694
- Drawert, F.; Beier, J. **(1976b)**: Monoprenylierte Acylphloroglucine. In: *Phytochemistry* 15(11), S. 1695–1696
- Dušek, M.; Olšovská, J.; Krofta, K.; Jurková, M.; Mikyška, A. **(2014)**: Qualitative determination of  $\beta$ -acids and their transformation products in beer and hop using HR/AM-LC-MS/MS. In: *J. Agric. Food Chem.* 62(31), S. 7690–7697

## E

- Ely, V.C.; Boldrini, I.I.; de Loreto Bordinon, S.A. **(2015)**: A new species of *Hypericum* (Hypericaceae) from southern Brazil. In: *Phytotaxa* 192(4), S. 290–295
- Erhardt, W.; Götz, E.; Bödeker, N.; Seybold, S.; Zander, R. **(2014)**: Zander. Handwörterbuch der Pflanzennamen, Stuttgart (Hohenheim), Ulmer, 19. Aufl.
- Ernst, E. (Hg.) **(2003)**: *Hypericum*. The genus *Hypericum*, London, Taylor & Francis

## F

- Finkel, T. **(1998)**: Oxygen radicals and signaling. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 10(2), S. 248–253
- Folkman, J. **(2007)**: Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 6(4), S. 273–286
- Folkman, J.; Klagsbrun, M. **(1987)**: Angiogenic factors. In: *Science* 235(4787), S. 442–447
- Förstermann, U.; Closs, E.I.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Schwarz, P.; Gath, I.; Kleinert, H. **(1994)**: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. In: *Hypertension* 23(6), S. 1121–1131

- Förstermann, U.; Sessa, W.C. **(2011)**: Nitric oxide synthases: regulation and function. In: *Eur. Heart J.* 33(7), S. 829–837
- Frohne, D.; Jensen, U. **(1998)**: Systematik des Pflanzenreichs. Unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen, Stuttgart, Wiss. Verl.ges, 5. Aufl.
- Fukui, M.; Song, J.-H.; Choi, J.; Choi, H.J.; Zhu, B.T. **(2009)**: Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. In: *Eur. J. Pharmacol.* 617, S. 1–11
- Fukuyama, Y.; Minami, H.; Kuwayama, A. **(1998)**: Garsubellins, polyisoprenylated phloroglucinol derivatives from *Garcinia subelliptica*. In: *Phytochemistry* 49(3), S. 853–857
- Füller, J.; Müller-Goymann, C.C. **(2018)**: Anti-proliferative and anti-migratory effects of hyperforin in 2D and 3D artificial constructs of human dermal fibroblasts - A new option for hypertrophic scar treatment? In: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126, S. 108–114

## G

- Gobbi, M., Dalla Valle, F., Ciapparelli, C., Diomedea, L., Morazzoni, P., Verotta, L., Caccia, S., Cervo, L., Mennini, T. **(1999)**: *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360(3), S. 262–269
- Gao, W.; Hou, W.-Z.; Zhao, J.; Xu, F.; Li, L.; Sun, H.; Xing, J.-G.; Peng, Y.; Wang, X.-L.; Ji, T.-F.; Gu, Z.-Y. **(2016a)**: Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners from *Hypericum scabrum*. In: *J. Nat. Prod.* 79(6), S. 1538–1547
- Gao, W.; Hu, J.-W.; Hou, W.-Z.; Xu, F.; Zhao, J.; Sun, H.; Xing, J.-G.; Peng, Y.; Wang, X.-L.; Ji, T.-F.; Li, L.; Gu, Z.-Y. **(2016b)**: Four new prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum scabrum*. In: *Tetrahedron Lett.* 57(21), S. 2244–2248
- Gao, W.; Hu, J.-W.; Xu, F.; Wei, C.-J.; Shi, M.-J.; Zhao, J.; Wang, J.-J.; Zhen, B.; Ji, T.-F.; Xing, J.-G.; Gu, Z.-Y. **(2016c)**: Polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum scabrum*. In: *Fitoterapia* 115, S. 128–134
- Gilbert, D. L.; Colton, C. A. **(2002)**: Reactive oxygen species in biological systems. Boston, Kluwer Academic Publishers
- Grossman, R.B.; Jacobs, H. **(2000)**: On the structures of plukenetiones B, D, and E and their relationships to other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. In: *Tetrahedron Lett.* 41(27), S. 5165–5169
- Guo, N.; Chen, X.-Q.; Zhao, Q.-S. **(2008)**: A new polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivative from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides* (Guttiferae). In: *Acta Botanica Yunnanica* 30(4), S. 515–518
- Guo, Y.; Zhang, N.; Chen, C.; Huang, J.; Li, X.-N.; Liu, J.; Zhu, H.; Tong, Q.; Zhang, J.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. **(2017)**: Tricyclic polyprenylated acylphloroglucinols from St John's Wort, *Hypericum perforatum*. In: *J. Nat. Prod.* 80(5), S. 1493–1504

Gurevich, A.I.; Dobrynin, V.N.; Kolosov, M.N.; Popavko, S.A.; Riabova, I.B. **(1971)**: Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. In: *Antibiotiki* 16(6), S. 510–513

Guzik, T.J.; Korbout, R.; Adamek-Guzik, T. **(2003)**: Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. In: *J. Physiol. Pharmacol.* 54(4), S. 469–487

## H

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **(2007)**: Free radicals in biology and medicine. Oxford, Oxford Univ. Press, 4. Aufl.

Hashida, C.; Tanaka, N.; Kashiwada, Y.; Ogawa, M.; Takaishi, Y. **(2008a)**: Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum perforatum* var. *angustifolium*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 56(8), S. 1164–1167

Hashida, C.; Tanaka, N.; Kawazoe, K.; Murakami, K.; Sun, H.-D.; Takaishi, Y.; Kashiwada, Y. **(2014)**: Hypelodins A and B, polyprenylated benzophenones from *Hypericum elodeoides*. In: *J. Nat. Med.* 68(4), S. 737–742

Hashida, W.; Tanaka, N.; Kashiwada, Y.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Takaishi, Y. **(2008b)**: Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. In: *Phytochemistry* 69(11), S. 2225–2230

Hazler Pilepić, K.; Morović, M.; Orač, F.; Šantor, M.; Vejnović, V. **(2010)**: RFLP analysis of cpDNA in the genus *Hypericum*. In: *Biologia* 65(5), S. 1

Henry, G.E.; Jacobs, H.; Carrington, C.M.S.; McLean, S.; Reynolds, W.F. **(1996)**: Plukenetione A. An unusual adamantyl ketone from *Clusia plukenetii* (Guttiferae). In: *Tetrahedron Lett.* 37(48), S. 8663–8666

Henry, G.E.; Jacobs, H.; Carrington, C.M.S.; McLean, S.; Reynolds, W.F. **(1999)**: Prenylated benzophenone derivatives from Caribbean *Clusia* species (Guttiferae). Plukenetiones B-G and xerophenone A. In: *Tetrahedron* 55(6), S. 1581–1596

Hevel, J.M.; White, K.A.; Marletta, M.A. **(1991)**: Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. In: *J. Biol. Chem.* 266(34), S. 22789–22791

Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z. **(1987)**: Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. In: *Science* 235(4787), S. 473–476

Hoffmann, P. **(2003)**: Malpighiales. In: John Wiley & Sons Ltd (Hg.): eLS: Chichester

Hu, J.-W.; Shi, M.-J.; Wang, J.-J.; Li, L.; Jiang, J.-D.; Ji, T.-F. **(2018)**: Methylated polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. In: *J. Nat. Prod.* 81(11), S. 2348–2356

Hu, L.-H.; Sim, K.-Y. **(1998)**: Complex caged polyisoprenylated benzophenone derivatives, sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. In: *Tetrahedron Lett.* 39(43), S. 7999–8002

- Hu, L.-H.; Sim, K.-Y. **(1999a)**: Cytotoxic polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives with an unusual adamantyl skeleton from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). In: *Org. Lett.* 1(6), S. 879–882
- Hu, L.-H.; Sim, K.-Y. **(1999b)**: Sampsoniones C-H, a unique family of polyprenylated benzophenone derivatives with the novel tetracyclo[7.3.1.1<sup>3,11</sup>.0<sup>3,7</sup>]tetradecane-2,12,14-trione skeleton, from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). In: *Tetrahedron Lett.* 40(4), S. 759–762
- Hu, L.-H.; Sim, K.-Y. **(2000)**: Sampsoniones A–M, a unique family of caged polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives, from *Hypericum sampsonii*. In: *Tetrahedron* 56(10), S. 1379–1386
- Huang, N.; Rizshsky, L.; Hauck, C.; Nikolau, B.J.; Murphy, P.A.; Birt, D.F. **(2011)**: Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages. In: *Phytochemistry* 72(16), S. 2015–2023
- Hunkapiller, T.; Hood, L. **(1989)**: Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. In: Dixon, F.J. (Hg.): *Advances in immunology*, Band. 44: San Diego/New York/London, Academic Press, S. 1–63

## I

- Ishida, Y.; Shiota, O.; Sekita, S.; Someya, K.; Tokita, F.; Nakane, T.; Kuroyanagi, M. **(2010)**: Polyprenylated benzoylphloroglucinol-type derivatives including novel cage compounds from *Hypericum erectum*. In: *Chem. Pharm. Bull.* 58(3), S. 336–343

## J

- Joussen, A.M.; Kirchhof, B.; Gottstein, C. **(2003)**: Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Möglichkeiten antiangiogener Therapie. In: *Ophthalmologie* 100(4), S. 284–291

## K

- Kalka, C.; Asahara, T.; Krone, W.; Isner, J.M. **(2000)**: Angiogenese und Vaskulogenese. Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisation. In: *Herz* 25(6), S. 611–622
- Kilbourn, R.G.; Belloni, P. **(1990)**: Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon  $\gamma$  in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 82(9), S. 772–776
- Kim, J.M.; Kim, J.S.; Jung, H.C.; Song, I.S.; Kim, C.Y. **(2002)**: Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells: possible role of interferon- $\gamma$  in polarized nitric oxide secretion. In: *Helicobacter* 7(2), S. 116–128

- Klinke, R.; Pape, H.-C.; Kurtz, A.; Silbernagl, S.; Baumann, R.; Brenner, B.; Gay, R.; Rothenburger, A. **(2010)**: Physiologie, Stuttgart, Thieme, 6. Aufl.
- Koeberle, A.; Pollastro, F.; Northoff, H.; Werz, O. **(2009)**: Myrtucommulone, a natural acylphloroglucinol, inhibits microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1. In: *Br. J. Pharmacol.* 156(6), S. 952–961
- Koltermann, A. **(2008)**: Influence of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 on signaling pathways in endothelial cells. Dissertation, LMU München
- König, R.; Winkler, G. (Hg.) **(1983)**: Plinius Naturkunde. Buch XXVI, Kapitel LXXX, München und Zürich, Artemis Verlag
- Korotkova, N.; Schneider, J.V.; Quandt, D.; Worberg, A.; Zizka, G.; Borsch, T. **(2009)**: Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of a recalcitrant clade with sequences of the *petD* group II intron. In: *Plant Syst. Evol.* 282(3-4), S. 201–228

## L

- Laroux, F.S.; Pavlick, K.P.; Hines, I.N.; Kawachi, S.; Harada, H.; Bharwani, S.; Hoffman, J.M.; Grisham, M.B. **(2001)**: Role of nitric oxide in inflammation. In: *Acta Physiol. Scand.* 173(1), S. 113–118
- Le Bot, M.; Corlay, N.; Michaud, A.; Pagie, S.; Richomme, P.; Charreau, B.; Derbré, S. **(2016)**: Chemically engineered extracts of St John's wort as sources of polyprenylated acylphloroglucinols to prevent endothelial dysfunction. In: *Planta Med.* 81(S 01), S1-S381
- Lee, J.-y.; Duke, R.K.; van Tran, H.; Hook, J.M.; Duke, C.C. **(2006)**: Hyperforin and its analogues inhibit CYP3A4 enzyme activity. In: *Phytochemistry* 67(23), S. 2550–2560
- Leonard, J.P.; Salpeter, M.M. **(1982)**: Calcium-mediated myopathy at neuromuscular junctions of normal and dystrophic muscle. In: *Exp. Neurol.* 76(1), S. 121–138
- Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M.I.; Nourshargh, S. **(2007)**: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nat. Rev. Immunol.* 7(9), S. 678–689
- Li, D.; Xue, Y.; Zhu, H.; Li, Y.; Sun, B.; Liu, J.; Yao, G.; Zhang, J.; Du, G.; Zhang, Y. **(2015a)**: Hyperattennins A–I, bioactive polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum* Choisy. In: *RSC Adv.* 5(7), S. 5277–5287
- Li, D.; Zhu, H.; Qi, C.; Xue, Y.; Yao, G.; Luo, Z.; Wang, J.; Zhang, J.; Du, G.; Zhang, Y. **(2015b)**: Two new adamantyl-like polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum* choisy. In: *Tetrahedron Lett.* 56(15), S. 1953–1955
- Liao, Y.; Liu, X.; Yang, J.; Lao, Y.-Z.; Yang, X.-W.; Li, X.-N.; Zhang, J.-J.; Ding, Z.-j.; Xu, H.-X.; Xu, G. **(2015)**: Hypersubones A and B, new polycyclic acylphloroglucinols with intriguing adamantane type cores from *Hypericum subsessile*. In: *Org. Lett.* 17(5), S. 1172–1175



- Liao, Y.; Yang, S.-Y.; Li, X.-N.; Yang, X.-W.; Xu, G. **(2016)**: Polyprenylated acylphloroglucinols from the fruits of *Hypericum henryi*. In: *Sci. China Chem.* 59(9), S. 1216–1223
- Liedlbier, C. **(2015)**: Quantifizierung von Acylphloroglucinolen per HPTLC. Masterarbeit, Universität Regensburg
- Linde, K.; Berner, M.M.; Kriston, L. **(2008)**: St John's wort for major depression. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
- Lindequist, U. **(2012)**: Polyketide. In: Teuscher, E.; Melzig, M.F. et al. (Hg.): Biogene Arzneimittel. Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie, 7. Aufl.: Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, S. 286–301
- Liu, R.; Su, Y.; Yang, J.; Wang, A. **(2017)**: Polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum scabrum*. In: *Phytochemistry* 142, S. 38–50
- Liu, R.-D.; Ma, J.; Yang, J.-B.; Wang, A.-G.; Su, Y.-L. **(2014)**: Two new polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum scabrum*. In: *J. Asian Nat. Prod. Res.* 16(7), S. 717–723
- Liu, X.; Yang, X.-W.; Chen, C.-Q.; Wu, C.-Y.; Zhang, J.-J.; Ma, J.-Z.; Wang, H.; Yang, L.-X.; Xu, G. **(2013a)**: Bioactive polyprenylated acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum cohaerens*. In: *J. Nat. Prod.* 76(9), S. 1612–1618
- Liu, X.; Yang, X.-W.; Chen, C.-Q.; Wu, C.-Y.; Zhang, J.-J.; Ma, J.-Z.; Wang, H.; Zhao, Q.-S.; Yang, L.-X.; Xu, G. **(2013b)**: Hypercohones A–C, acylphloroglucinol derivatives with *homo*-adamantane cores from *Hypericum cohaerens*. In: *Nat. Prod. Bioprospect.* 3(5), S. 233–237
- Lowenstein, C.J.; Alley, E.W.; Raval, P.; Snowman, A.M.; Snyder, S.H.; Russell, S.W.; Murphy, W.J. **(1993)**: Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon  $\gamma$  and lipopolysaccharide. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(20), S. 9730–9734
- Lucas, D.R.; Newhouse, J.P. **(1957)**: The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. In: *Archives of Ophthalmology* 58(2), S. 193–201
- Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. **(2006)**: Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker, Stuttgart, Thieme, 16. Aufl.

## M

- MacDermott, A.B.; Dale, N. **(1987)**: Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. In: *Trends in Neurosciences* 10(7), S. 280–284
- MacMicking, J.; Xie, Q.W.; Nathan, C. **(1997)**: Nitric oxide and macrophage function. In: *Annu. Rev. Immunol.* 15, S. 323–350

- Madeddu, P. **(2005)**: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. In: *Exp. Physiol.* 90(3), S. 315–326
- Maher, P.; Davis, J.B. **(1996)**: The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. In: *J. Neurosci.* 16(20), S. 6394–6401
- Martínez-Poveda, B.; Quesada, A.R.; Medina, M.A. **(2005)**: Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. In: *Int. J. Cancer* 117(5), S. 775–780
- Martínez-Poveda, B.; Verotta, L.; Bombardelli, E.; Quesada, A.R.; Medina, M.A. **(2010)**: Tetrahydrohyperforin and octahydrohyperforin are two new potent inhibitors of angiogenesis. In: *PLoS ONE* 5(3), e9558
- Mayer, M.L.; Westbrook, G.L. **(1987)**: The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. In: *Prog. Neurobiol.* 28(3), S. 197–276
- McCall, T.B.; Palmer, R.M.; Moncada, S. **(1991)**: Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. In: *Eur. J. Immunol.* 21(10), S. 2523–2527
- McCandlish, L.E.; Hanson, J.C.; Stout, G.H. **(1976)**: The structures of two derivatives of bicyclo[3,3,1]nonane-2,4,9-trione. A natural product: Clusianone, C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>, and trimethylated catechinic acid, C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>. In: *Acta Cryst.* 32(6), S. 1793–1801
- McEver, R.P. **(2002)**: Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 14(5), S. 581–586
- McEver, R.P.; Cummings, R.D. **(1997)**: Perspectives series: Cell adhesion in vascular biology. role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. In: *J. Clin. Invest.* 100(11), S. 97–103
- Mennini, T.; Gobbi, M. **(2004)**: The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. In: *Life Sci.* 75, S. 1021–1027
- Meseguer, A.S.; Sanmartín, I. **(2012)**: Paleobiology of the genus *Hypericum* (Hypericaceae): a survey of the fossil record and its palaeogeographic implications. In: *Anal. Jard. Bot. Madr.* 69(1), S. 97–106
- Misko, T.P.; Schilling, R.J.; Salvemini, D.; Moore, W.M.; Currie, M.G. **(1993)**: A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. In: *Anal. Biochem.* 214(1), S. 11–16
- Momekov, G.; Ferdinandov, D.; Zheleva-Dimitrova, D.; Nedialkov, P.; Girreser, U.; Kitanov, G. **(2008)**: Cytotoxic effects of hyperatomarin, a prenylated phloroglucinol from *Hypericum annulatum* Moris subsp. *annulatum*, in a panel of malignant cell lines. In: *Phytomedicine* 15(11), S. 1010–1015
- Monache, F.D.; Monache, G.D.; Gacs-Baitz, E. **(1991)**: Prenylated benzophenones from *Clusia sandiensis*. In: *Phytochemistry* 30(6), S. 2003–2005

- Mosmann, T. **(1983)**: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J. Immunol. Methods* 65(1-2), S. 55–63
- Muller, W.E., Rolli, M., Schafer, C., Hafner, U. **(1997)**: Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. In: *Pharmacopsychiatry* 30 (Suppl. 2), S. 102–107
- Muller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., Schafer, C. **(1998)**: Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. In: *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl. 1), S. 16–21
- Murphy, T.H.; Miyamoto, M.; Sastre, A.; Schnaar, R.L.; Coyle, J.T. **(1989)**: Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. In: *Neuron* 2(6), S. 1547–1558
- Mutschler, E.; Schaible, H.-G.; Vaupel, P.; Thews, G. **(2007)**: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges, 6. Aufl.

## N

- Nedialkov, P.T.; Zheleva-Dimitrova, D.; Momekov, G.; Karlov, K.; Girreser, U.; Kitanov, G.M. **(2011)**: Elegaphenone and 7-*epi*-clusianone, the major cytotoxic constituents of *Hypericum elegans*. In: *Nat. Prod. Res.* 25(18), S. 1743–1750
- Nguyen, L.-T.T.; Lai, N.T.D.D.T.; Nguyen, L.T.T.; Nguyen, H.T.; Nguyen, D.M.; Nguyen, L.-H.D. **(2016)**: Thoreliolides A and B, two polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives with a new carbon skeleton from the fruits of *Calophyllum thorelii*. In: *Tetrahedron Lett.* 57(25), S. 2737–2741
- Nicoll, R.A.; Kauer, J.A.; Malenka, R.C. **(1988)**: The current excitement in long-term potentiation. In: *Neuron* 1(2), S. 97–103
- Nigam, S.K.; Banerji, R.; Rebuffat, S.; Cesario, M.; Pascard, C.; Bodo, B. **(1988)**: Soulattrone A, a C<sub>24</sub> terpenoid from *Calophyllum soulattri*. In: *Phytochemistry* 27(2), S. 527–530
- Nishida, N.; Yano, H.; Nishida, T.; Kamura, T.; Kojiro, M. **(2006)**: Angiogenesis in cancer. In: *Vasc. Health Risk Manag.* 2(3), S. 213–219
- Noeske, K. **(1966)**: Die Bindung von Kristallviolett an Desoxyribonukleinsure. In: *Histochemie* 7(3), S. 273–287
- Nürk, N.M.; Crockett, S.L. **(2011)**: Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* Species of the mediterranean basin. In: *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5(Special Issue 1), S. 14–28
- Nürk, N.M.; Madriñán, S.; Carine, M.A.; Chase, M.W.; Blattner, F.R. **(2013)**: Molecular phylogenetics and morphological evolution of St. John's wort (*Hypericum*; Hypericaceae). In: *Mol. Phylogenet. Evol.* 66(1), S. 1–16

**O**

- Oeckinghaus, A.; Hayden, M.S.; Ghosh, S. **(2011)**: Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. In: *Nat. Immunol.* 12(8), S. 695–708
- Olney, J.W.; Ho, O.L. **(1970)**: Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. In: *Nature* 227(5258), S. 609–611
- Ozaki, S.-i.; Imai, H.; Iwakiri, T.; Sato, T.; Shimoda, K.; Nakayama, T.; Hamada, H. **(2012)**: Regioselective glucosidation of *trans*-resveratrol in *Escherichia coli* expressing glucosyltransferase from *Phytolacca americana*. In: *Biotechnol. Lett.* 34(3), S. 475–481

**P**

- Pal Singh, I.; Bharate, S.B. **(2006)**: Phloroglucinol compounds of natural origin. In: *Nat. Prod. Rep.* 23(4), S. 558–591
- Piccinelli, A.L.; Cuesta-Rubio, O.; Chica, M.B.; Mahmood, N.; Pagano, B.; Pavone, M.; Barone, V.; Rastrelli, L. **(2005)**: Structural revision of clusianone and 7-*epi*-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. In: *Tetrahedron* 61(34), S. 8206–8211
- Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; Tata, V. de; Casini, A.F. **(2003)**: The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. In: *Biochem. Pharmacol.* 66(8), S. 1499–1503
- Puyal, J.; Ginet, V.; Clarke, P.G.H. **(2013)**: Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. In: *Prog. Neurobiol.* 105, S. 24–48

**Q**

- Qureshi, N.; Porter, W. **(1981)**: Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. In: Porter, J.W.; Spurgeon, S.L. (Hg.): *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, 1. Aufl.: New York, John Wiley & Sons, S. 47–94

**R**

- Raschke, W.C.; Baird, S.; Ralph, P.; Nakoinz, I. **(1978)**: Functional macrophage cell lines transformed by Abelson Leukemia Virus. In: *Cell* 15(1), S. 261–267
- Rezanka, T.; Sigler, K. **(2007)**: Sinaicinone, a complex adamantanyl derivative from *Hypericum sinaicum*. In: *Phytochemistry* 68(9), S. 1272–1276
- Rink, L.; Kruse, A.; Haase, H. **(2012)**: *Immunologie für Einsteiger*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag

- Robson, N.K.B. (1977): Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 1. Infrageneric classification. In: *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Botany)* 5, S. 291–355
- Robson, N.K.B. (2010): Studies in the genus *Hypericum* L (Hypericaceae) 5(2). Sections 17. *Hirtella* to 19. *Coridium*. In: *Phytotaxa* 4(1), S. 127
- Roebuck, K.A.; Finnegan, A. (1999): Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. In: *J. Leukoc. Biol.* 66(6), S. 876–888
- Rohdich, F.; Hecht, S.; Gärtner, K.; Adam, P.; Krieger, C.; Amslinger, S.; Arigoni, D.; Bacher, A.; Eisenreich, W. (2002): Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(3), S. 1158–1163
- Rothley, M.; Schmid, A.; Thiele, W.; Schacht, V.; Plaumann, D.; Gartner, M.; Yektaoglu, A.; Bruyère, F.; Noël, A.; Giannis, A.; Sleeman, J.P. (2009): Hyperforin and aristoforin inhibit lymphatic endothelial cell proliferation in vitro and suppress tumor-induced lymphangiogenesis *in vivo*. In: *Int. J. Cancer* 125(1), S. 34–42
- Rouger, C.; Pagie, S.; Derbré, S.; Le Ray, A.-M.; Richomme, P.; Charreau, B. (2016): Prenylated polyphenols from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* with immunomodulatory activity on endothelial cells. In: *PLoS ONE* 11(12), e0167361
- Roz, N., Mazur, Y., Hirshfeld, A., Rehavi, M. (2002): Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. In: *Life Sci.* 71(19), S. 2227–2237
- Roz, N., Rehavi, M. (2003): Hyperforin inhibits vesicular uptake of monoamines by dissipating pH gradient across synaptic vesicle membrane. In: *Life Sci.* 73(4), S. 461–470
- Rui, D.-Y.; Chen, X.-Q.; Li, Z.; Tang, L.-Y.; Li, F. (2017): Chemical constituents of *Hypericum petiolulatum*. In: *Chem. Nat. Compd.* 53(3), S. 457–462

## S

- Salvucci, O.; Kolb, J.P.; Dugas, B.; Dugas, N.; Chouaib, S. (1998): The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. In: *Blood* 92(6), S. 2093–2102
- Santos, M.H.; Speziali, N.L.; Nagem, T.J.; Oliveira, T.T. (1998): Epiclusianone: a new natural product derivative of bicyclo[3.3.1]nonane-2,4,9-trione. In: *Acta Cryst.* 54(12), S. 1990–1992
- Savikin-Fodulović, K.; Aljancić, I.; Vajs, V.; Menković, N.; Macura, S.; Gojgić, G.; Milosavljević, S. (2003): Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp. *degenii*. In: *J. Nat. Prod.* 66(9), S. 1236–1238
- Schempp, C.M.; Kiss, J.; Kirkin, V.; Averbek, M.; Simon-Haarhaus, B.; Kremer, B.; Termeer, C.C.; Sleeman, J.; Simon, J.C. (2005): Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. In: *Planta Med.* 71(11), S. 999–1004

- Schmidt, S. (2013): Phytochemische und pharmakologische *in vitro* Untersuchungen zu *Hypericum empetrifolium* WILLD. Dissertation, Universität Regensburg
- Schmidt, S.; Jürgenliemk, G.; Schmidt, T.J.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. (2012a): Bi-, tri-, and polycyclic acylphloroglucinols from *Hypericum empetrifolium*. In: *J. Nat. Prod.* 75(10), S. 1697–1705
- Schmidt, S.; Jürgenliemk, G.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. (2012b): Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. In: *Phytochemistry* 77, S. 218–225
- Schütt, H.; Schulz, V. (2007): *Hypericum*. In: Blaschek, W.; Ebel, S. et al. (Hg.): Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, Band. 8., 6. Aufl.: Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges, S. 742–780
- Serbina, N.V.; Salazar-Mather, T.P.; Biron, C.A.; Kuziel, W.A.; Pamer, E.G. (2003): TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. In: *Immunity* 19(1), S. 59–70
- Sies, H. (1991): Oxidative stress: From basic Research to clinical application. In: *Am. J. Med.* 91(3C), 31S-38S
- Siman, R.; Noszek, J.C. (1988): Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. In: *Neuron* 1(4), S. 279–287
- Singer, A.; Wonnemann, M.; Müller, W.E. (1999): Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290(3), S. 1363–1368
- Smelcerovic, A.; Spiteller, M. (2006): Phytochemical analysis of nine *Hypericum* L. species from Serbia and the F.Y.R. Macedonia. In: *Pharmazie* 61(3), S. 251–252
- Spohn, M. (2015): Was blüht denn da? Der Fotoband, Stuttgart, Kosmos
- Stevens, P.F. (2007): Hypericaceae. In: Kubitzki Klaus (Hg.): Flowering plants eudicots. The families and genera of vascular plants, Band. 9: Berlin, Heidelberg, Springer, S. 194–201
- Stuehr, D.J.; Cho, H.J.; Kwon, N.S.; Weise, M.F.; Nathan, C.F. (1991): Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(17), S. 7773–7777
- Sun, Q.; Heilmann, J.; König, B. (2015): Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties – a review from the chemical point of view. In: *J. Org. chem.* 11, S. 249–264

## T

- Tahergorabi, Z.; Khazaei, M. (2012): A review on angiogenesis and its assays. In: *Iran. J. Basic Med. Sci.* 15(6), S. 1110–1126

- Tak, P.P.; Firestein, G.S. **(2001)**: NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. In: *J. Clin. Invest.* 107(1), S. 7–11
- Tala, M.F.; Talontsi, F.M.; Zeng, G.-Z.; Wabo, H.K.; Tan, N.-H.; Spiteller, M.; Tane, P. **(2015)**: Antimicrobial and cytotoxic constituents from native cameroonian medicinal plant *Hypericum riparium*. In: *Fitoterapia* 102, S. 149–155
- Tan, S.; Sagara, Y.; Liu, Y.; Maher, P.; Schubert, D. **(1998a)**: The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. In: *J. Cell Biol.* 141(6), S. 1423–1432
- Tan, S.; Schubert, D.; Maher, P. **(2001)**: Oxytosis: A novel form of programmed cell death. In: *CTMC* 1(6), S. 497–506
- Tan, S.; Wood, M.; Maher, P. **(1998b)**: Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. In: *J. Neurochem.* 71(1), S. 95–105
- Tanaka, N.; Takaishi, Y.; Shikishima, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.; Lee, K.-H.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Kodzhimatov, O.K.; Ashurmetov, O. **(2004)**: Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*. In: *J. Nat. Prod.* 67(11), S. 1870–1875
- Tanaka, N.; Yano, Y.; Tatano, Y.; Kashiwada, Y. **(2016)**: Hypatulins A and B, meroterpenes from *Hypericum patulum*. In: *Org. Lett.* 18(20), S. 5360–5363
- Tezuka, H.; Abe, Y.; Iwata, M.; Takeuchi, H.; Ishikawa, H.; Matsushita, M.; Shiohara, T.; Akira, S.; Ohteki, T. **(2007)**: Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. In: *Nature* 448(7156), S. 929–933
- The Angiosperm Phylogeny Group **(2003)**: An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. In: *Bot. J. Linn. Soc.* 141(4), S. 399–436
- Tian, W.-J.; Qiu, Y.-Q.; Chen, J.-J.; Yao, X.-J.; Wang, G.-H.; Dai, Y.; Chen, H.-F.; Yao, X.-S. **(2017)**: Norsampson E, an unprecedented decarbonyl polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol with a homoadamantyl core from *Hypericum sampsonii*. In: *RSC Adv.* 7(53), S. 33113–33119
- Tian, W.-J.; Qiu, Y.-Q.; Jin, X.-J.; Chen, H.-F.; Yao, X.-J.; Dai, Y.; Yao, X.-S. **(2014a)**: Novel polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. In: *Tetrahedron* 70(43), S. 7912–7916
- Tian, W.-J.; Qiu, Y.-Q.; Jin, X.-J.; Chen, H.-F.; Yao, X.-J.; Dai, Y.; Yao, X.-S. **(2016)**: Hypersampsones S–W, new polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. In: *RSC Adv.* 6(56), S. 50887–50894
- Tian, W.-J.; Qiu, Y.-Q.; Yao, X.-J.; Chen, H.-F.; Dai, Y.; Zhang, X.-K.; Yao, X.-S. **(2014b)**: Dioxasampsones A and B, two polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with unusual epoxy-ring-fused skeleton from *Hypericum sampsonii*. In: *Org. Lett.* 16(24), S. 6346–6349

- Tian, W.-J.; Yu, Y.; Yao, X.-J.; Chen, H.-F.; Dai, Y.; Zhang, X.-K.; Yao, X.-S. **(2014c)**: Norsampsones A-D, four new decarbonyl polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. In: *Org. Lett.* 16(13), S. 3448–3451
- Ting, C.-W.; Hwang, T.-L.; Chen, I.-S.; Cheng, M.-J.; Sung, P.-J.; Yen, M.-H.; Chen, J.-J. **(2014)**: Garcimultiflorone G, a novel benzoylphloroglucinol derivative from *Garcinia multiflora* with inhibitory activity on neutrophil pro-inflammatory responses. In: *Chem. Biodivers.* 11(5), S. 819–824
- Trifunović, S.; Vajs, V.; Macura, S.; Juranić, N.; Djarmati, Z.; Jankov, R.; Milosavljević, S. **(1998)**: Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. In: *Phytochemistry* 49(5), S. 1305–1310

**V**

- van de Stolpe, A.; van der Saag, P.T. **(1996)**: Intercellular adhesion molecule-1. In: *J. Mol. Med.* 74(1), S. 13–33
- Volkov, I.B. **(2017)**: Phytochemical and pharmacological study of *Hypericum triquetrifolium* TURRA. Dissertation, Universität Regensburg
- von Bingen, H. **(1991)**: Heilkraft der Natur. Physica, Augsburg, Pattloch-Verl.

**W**

- Wang, K.; Wang, Y.-Y.; Gao, X.; Chen, X.-Q.; Peng, L.-Y.; Li, Y.; Xu, G.; Zhao, Q.-S. **(2012)**: Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols and cytotoxic constituents of *Hypericum androsaemum*. In: *Chem. Biodivers.* 9(6), S. 1213–1220
- Wang, Z.-Q.; Li, X.-Y.; Hu, D.-B.; Long, C.-L. **(2018)**: Cytotoxic garcimultiflorones K-Q, lavandulyl benzophenones from *Garcinia multiflora* branches. In: *Phytochemistry* 152, S. 82–90
- Wanka, L.; Iqbal, K.; Schreiner, P.R. **(2013)**: The lipophilic bullet hits the targets: Medicinal chemistry of adamantane derivatives. In: *Chem. Rev.* 113(5), S. 3516–3604
- Weng, J.-R.; Lin, C.-N.; Tsao, L.-T.; Wang, J.-P. **(2003)**: Terpenoids with a new skeleton and novel triterpenoids with anti-inflammatory effects from *Garcinia subelliptica*. In: *Chemistry* 9(22), S. 5520–5527
- Weng, J.-R.; Tsao, L.-T.; Wang, J.-P.; Wu, R.-R.; Lin, C.-N. **(2004)**: Anti-inflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*. In: *J. Nat. Prod.* 67(11), S. 1796–1799
- Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. **(2001a)**: Further prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. In: *HCA* 84(11), S. 3380–3392



- Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. **(2001b)**: New prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. In: *J. Nat. Prod.* 64(6), S. 701–706
- Winkelmann, K.; San, M.; Kypriotakis, Z.; Skaltsa, H.; Bosilij, B.; Heilmann, J. **(2003)**: Antibacterial and cytotoxic activity of prenylated bicyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum amblycalyx*. In: *Z. Naturforsch. C* 58(7-8), S. 527–532
- Winkler, J.; Ludolph, A.C.; Arnim, C.v. (Hg.) **(2004)**: Neurodegenerative Erkrankungen des Alters, Stuttgart, Thieme
- Wu, C.-C.; Yen, M.-H.; Yang, S.-C.; Lin, C.-N. **(2008)**: Phloroglucinols with antioxidant activity and xanthonolignoids from the heartwood of *Hypericum geminiflorum*. In: *J. Nat. Prod.* 71(6), S. 1027–1031
- Wurdack, K.J.; Davis, C.C. **(2009)**: Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. In: *Am. J. Bot.* 96(8), S. 1551–1570

## X

- Xiao, Z.Y.; Mu, Q.; Shiu, W.K.P.; Zeng, Y.H.; Gibbons, S. **(2007)**: Polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *J. Nat. Prod.* 70(11), S. 1779–1782
- Xiao, Z.Y.; Zeng, Y.H.; Mu, Q.; Shiu, W.K.P.; Gibbons, S. **(2010)**: Prenylated benzophenone peroxide derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Chem. Biodivers.* 7(4), S. 953–958
- Xin, W.-b.; Man, X.-h.; Zheng, C.-j.; Jia, M.; Jiang, Y.-p.; Zhao, X.-x.; Jin, G.-l.; Mao, Z.-j.; Huang, H.-q.; Qin, L.-p. **(2012)**: Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Fitoterapia* 83(8), S. 1540–1547
- Xu, W.-J.; Zhu, M.-D.; Wang, X.-B.; Yang, M.-H.; Luo, J.; Kong, L.-Y. **(2015)**: Hypermongones A–J, rare methylated polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from the flowers of *Hypericum monogynum*. In: *J. Nat. Prod.* 78(5), S. 1093–1100

## Y

- Yang, J.-B.; Liu, R.-D.; Ren, J.; Wei, Q.; Wang, A.-G.; Su, Y.-L. **(2016)**: Two new prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum scabrum*. In: *J. Asian Nat. Prod. Res.* 18(5), S. 436–442
- Yang, X.-W.; Ding, Y.; Zhang, J.-J.; Liu, X.; Yang, L.-X.; Li, X.-N.; Ferreira, D.; Walker, L.A.; Xu, G. **(2014)**: New acylphloroglucinol derivatives with diverse architectures from *Hypericum henryi*. In: *Org. Lett.* 16(9), S. 2434–2437
- Yang, X.-W.; Grossman, R.B.; Xu, G. **(2018)**: Research progress of polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. In: *Chem. Rev.* 118(7), S. 3508–3558

- Yang, X.-W.; Li, M.-M.; Liu, X.; Ferreira, D.; Ding, Y.; Zhang, J.-J.; Liao, Y.; Qin, H.-B.; Xu, G. **(2015)**: Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners possessing diverse structures from *Hypericum henryi*. In: *J. Nat. Prod.* 78(4), S. 885–895
- Yang, X.-W.; Wang, H.; Ma, W.-G.; Xia, F.; Xu, G. **(2017a)**: homo-adamantane type polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum pseudohenryi*. In: *Tetrahedron* 73(5), S. 566–570
- Yang, X.-W.; Yang, J.; Xu, G. **(2017b)**: Skeleton reassignment of type C polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. In: *J. Nat. Prod.* 80(1), S. 108–113
- Ye, Y.; Yang, X.-W.; Xu, G. **(2016)**: Unusual adamantane type polyprenylated acylphloroglucinols with an oxirane unit and their structural transformation from *Hypericum hookerianum*. In: *Tetrahedron* 72(22), S. 3057–3062

**Z**

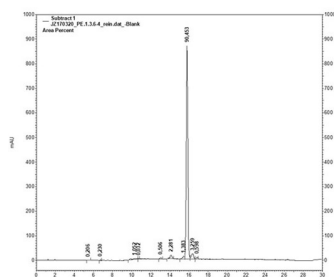
- Zeng, Y.H.; Mu, Q.; Xiao, Z.Y.; Xu, Y.; Rahman, M.M.; Gibbons, S. **(2009)**: Geranyl bearing polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Chem. Lett.* 38(5), S. 440–441
- Zeng, Y.-H.; Osman, K.; Xiao, Z.-Y.; Gibbons, S.; Mu, Q. **(2012)**: Four geranyl-bearing polyisoprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Phytochem. Lett.* 5(1), S. 200–205
- Zeng, Y.-R.; Yi, P.; Gu, W.; Xiao, C.-X.; Huang, L.-J.; Tian, D.-S.; Yan, H.; Chen, D.-Z.; Yuan, C.-M.; Hao, X.-J. **(2018)**: Hypermonins A and B, two 6-norpolyprenylated acylphloroglucinols with unprecedented skeletons from *Hypericum monogynum*. In: *Org. Biomol. Chem.* 16(22), S. 4195–4198
- Zhang, J.-S.; Zou, Y.-H.; Guo, Y.-Q.; Li, Z.-Z.; Tang, G.-H.; Yin, S. **(2016)**: Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols: natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *Hypericum sampsonii*. In: *RSC Adv.* 6(58), S. 53469–53476
- Zheleva-Dimitrova, D.; Nedialkov, P.; Momekov, G. **(2013)**: Benzophenones from *Hypericum elegans* with antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential. In: *Pharmacog. Mag.* 9, S. 1–5
- Zhou, Z.-b.; Li, Z.-R.; Wang, X.-B.; Luo, J.-g.; Kong, L.-Y. **(2016a)**: Polycyclic polyprenylated derivatives from *Hypericum uralum*: Neuroprotective effects and antidepressant-like activity of Uralodin A. In: *J. Nat. Prod.* 79(5), S. 1231–1240
- Zhou, Z.-b.; Zhang, Y.-m.; Luo, J.-g.; Kong, L.-Y. **(2016b)**: Cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol derivatives and xanthenes from *Hypericum attenuatum*. In: *Phytochem. Lett.* 15, S. 215–219
- Zhou, Z.-b.; Zhang, Y.-m.; Pan, K.; Luo, J.-g.; Kong, L.-Y. **(2014)**: Cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum*. In: *Fitoterapia* 95, S. 1–7

- Zhu, H.; Chen, C.; Liu, J.; Sun, B.; Wei, G.; Li, Y.; Zhang, J.; Yao, G.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. **(2015a)**: Hyperascyrone A-H, polyprenylated spirocyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron* Linn. In: *Phytochemistry* 115, S. 222–230
- Zhu, H.; Chen, C.; Tong, Q.; Chen, X.; Yang, J.; Liu, J.; Sun, B.; Wang, J.; Yao, G.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. **(2015b)**: Hyperisampsins H-M, cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. In: *Sci. Rep.* 5, S. 14772
- Zhu, H.; Chen, C.; Yang, J.; Li, D.; Zhang, J.; Guo, Y.; Wang, J.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. **(2016a)**: Hyperhexanone A, a crucial intermediate from bicyclo[3.3.1]- to cyclohexanone monocyclic-polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. In: *Tetrahedron* 72(31), S. 4655–4659
- Zhu, H.; Chen, C.; Yang, J.; Li, X.-N.; Liu, J.; Sun, B.; Huang, S.-X.; Li, D.; Yao, G.; Luo, Z.; Li, Y.; Zhang, J.; Xue, Y.; Zhang, Y. **(2014)**: Bioactive acylphloroglucinols with adamantyl skeleton from *Hypericum sampsonii*. In: *Org. Lett.* 16(24), S. 6322–6325
- Zhu, H.-C.; Chen, C.-M.; Zhang, J.-W.; Guo, Y.; Tan, D.-D.; Wei, G.-Z.; Yang, J.; Wang, J.-P.; Luo, Z.-W.; Xue, Y.-B.; Zhang, Y.-H. **(2016b)**: Hyperisampsins N and O, two new benzoylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. In: *Chin. Chem. Lett.* 28(5), S. 986–990
- Zündorf, I.; Dinger, T. **(2007)**: Getreu dem Motto: Von der Versorgung abschnüren! Angiogenese-Inhibitoren der Zukunft. In: *Pharm. Unserer Zeit* 36(6), S. 452–461

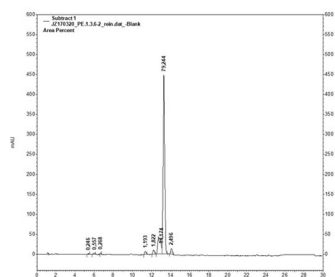
## 8 ANHANG

**Tabelle 71** Reinheitsbestimmung per HPLC der isolierten Verbindungen

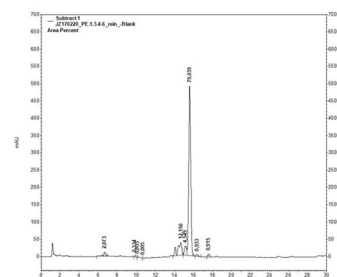
### Substanz 1



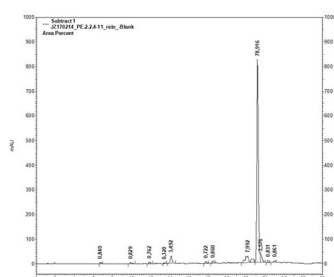
### Substanz 2



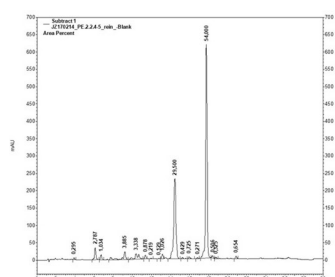
### Substanz 3



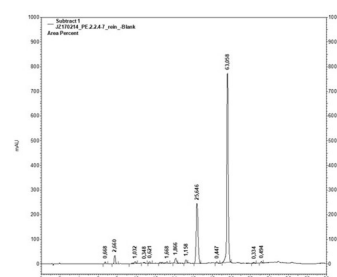
### Substanz 4



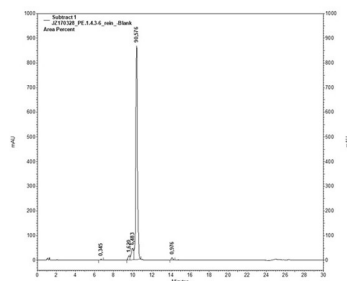
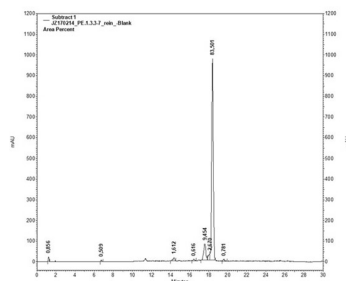
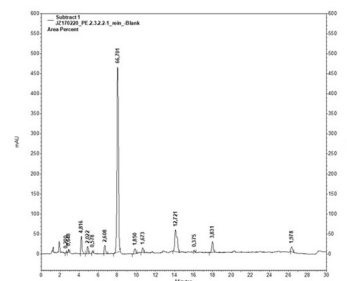
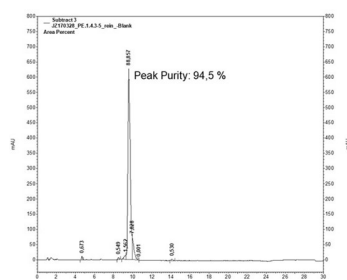
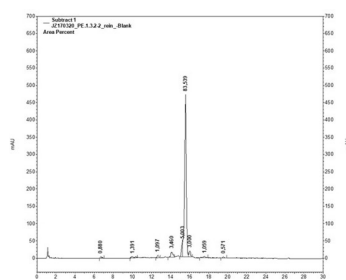
### Substanz 5



### Substanz 6

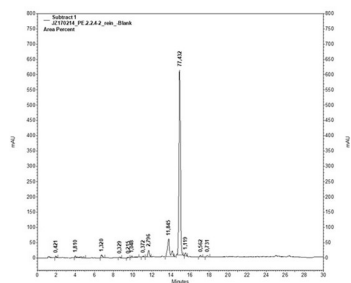


Fortsetzung Tabelle 71

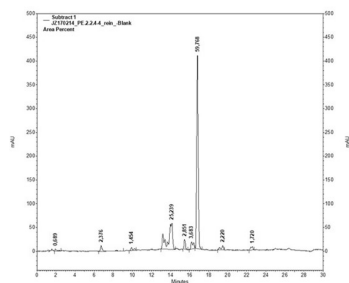
**Substanz 13****Substanz 14****Substanz 15****Substanz 16****Substanz 17**

Fortsetzung Tabelle 71

## Substanz 29



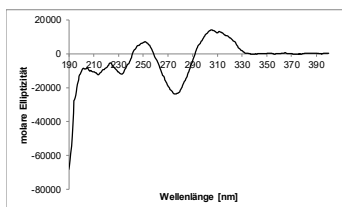
## Substanz 30



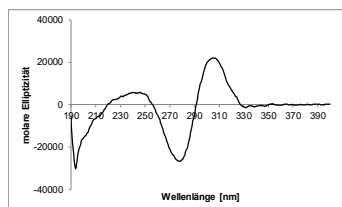
## CD-Spektren

Tabelle 72 CD-Spektren der isolierten Verbindungen

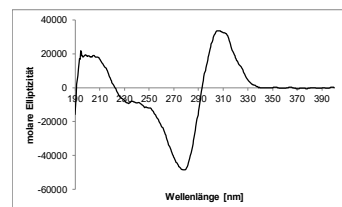
**Substanz 1**



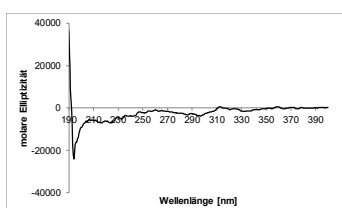
**Substanz 2**



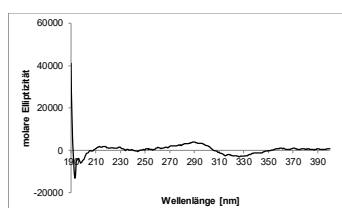
**Substanz 3**



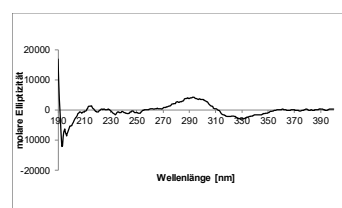
**Substanz 4**



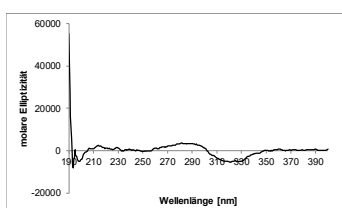
**Substanz 5**



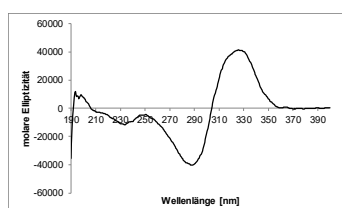
**Substanz 6**



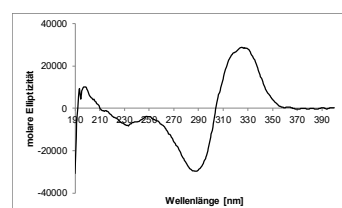
**Substanz 7**



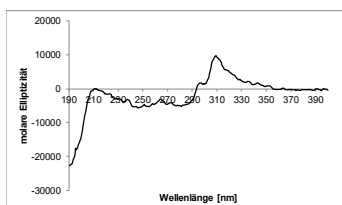
**Substanz 8**



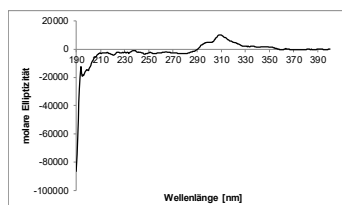
**Substanz 9**



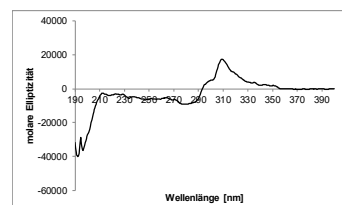
**Substanz 10**



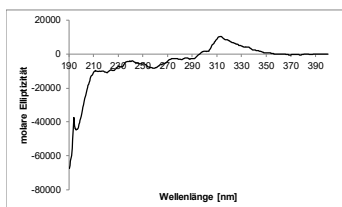
**Substanz 11**



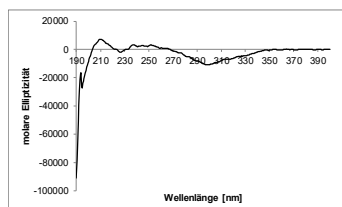
**Substanz 12**



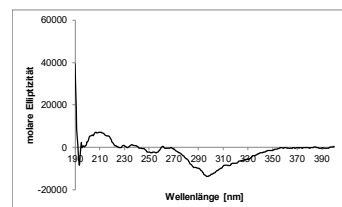
**Substanz 13**



**Substanz 14**

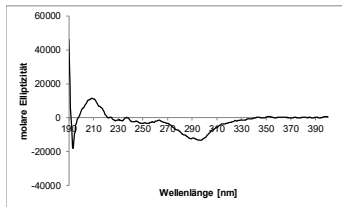


**Substanz 15**

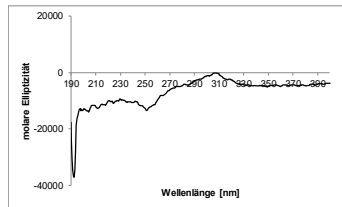


## Fortsetzung Tabelle 72

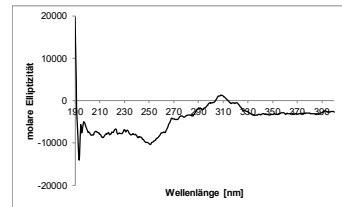
## Substanz 16



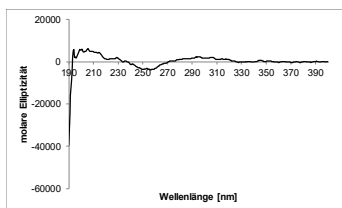
## Substanz 17



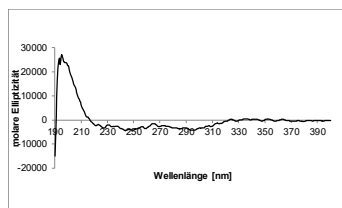
## Substanz 18



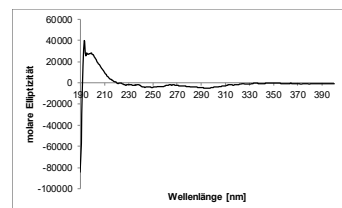
## Substanz 19



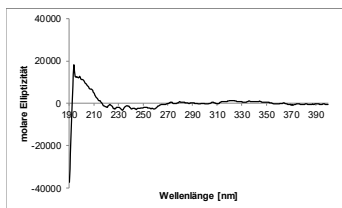
## Substanz 20



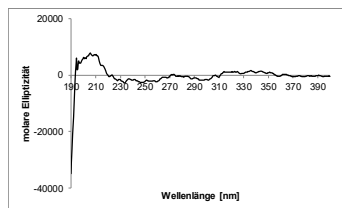
## Substanz 21



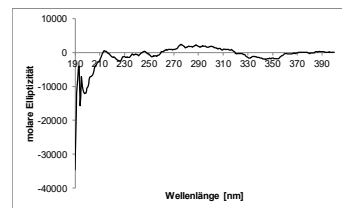
## Substanz 22



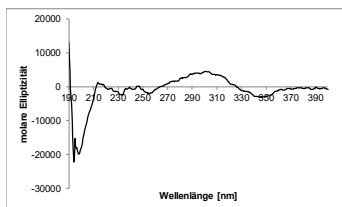
## Substanz 23



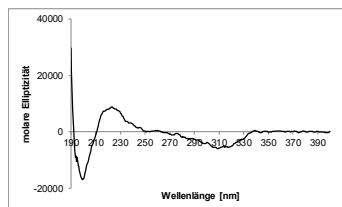
## Substanz 28



## Substanz 29



## Substanz 30

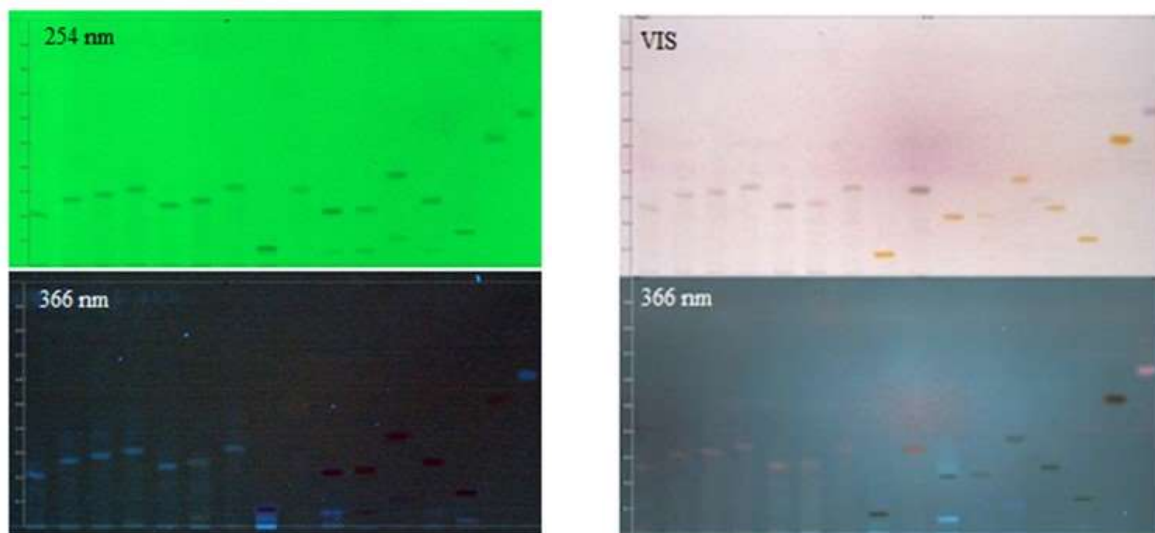




*DC-Bilder verschiedener Acylphloroglucinole aus der Masterarbeit von Christina Liedlbier*

underivatisiert

Derivatisierung mit AAS



**Abbildung 156** DC-Bilder verschiedener Acylphloroglucinole von Christina Liedlbier

## 9 ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGKEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Regensburg, den

Unterschrift